Untersuchungen zur Immunisierung gegen die Trypanosoma evansi-Infektion bei der Maus

Uta Hertkorn

1981

Aus dem Institut für Vergleichende Tropenmedizin und
Parasitologie der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. J. Boch
Angefertigt unter Leitung von Prof.Dr.H.K.Dennig

Untersuchungen zur Immunisierung gegen die Trypanosoma evansi-Infektion bei der Maus

Inaugural Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Uta Hertkorn
aus
Friedrichshafen .

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Referent: Prof. Dr. H. K. Dennig

Korreferent: Prof. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 27. Februar 1981

UNIV. LEIDEN BIBL.

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Immunisierung gegen die Trypanosomiasis unter besonderer Berücksichtigung der T. evansi-Infektion (anhand der Literatur)	2
3.	Eigene Untersuchungen	9
3.1.	Material und Methoden	9
3.2.	Versuche und Ergebnisse	16
3.2.1.	Untersuchungen zur Immunisierung mit schwach virulenten Parasiten (T. evansi, Variante Bali; T. evansi, Stamm Kairo) gegen virulente Parasiten von T. evansi (T. evansi, Stamm Bali; T. evansi, "Kairo Passage")	16
3.2.2.	Abschwächung von T. evansi, Stamm Bali durch direkte Einwirkung von Berenil^{R}	20
3.2.2.1.	Versuche mit verschiedenen Berenil-Konzentrationen	21
3.2.2.2.	Versuche mit unterschiedlich langen Einwirkungszeiten der Berenil-BSG-Lösungen	22
3.2.3.	Immunisierung mit abgeschwächten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali	23
3.2.3.1.	Immunisierung mit parasitiertem Vollblut und Passage-Versuche	23
3.2.3.2.	Immunisierung mit isolierten Parasiten	30
3.2.4.	Immunisierung mit abgetöteten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali	32
3.2.4.1.	Abtötung in EDTA-Röhrchen	32
3.2.4.2.	Abtötung mit β-Propiolacton	32
3.2.5.	Antikörpertiter-Verlauf bei immunisierten Mäusen vor und nach der Belastungsinfektion	33
4.	Besprechung der Ergebnisse	36
5.	Zusammenfassung	43
	Summary	
6.	Literaturverzeichnis	45
	Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Trypanosoma evansi, der Erreger der als Surra bekannten Erkrankung von Haustieren, ist vor allem für Kamele, Pferde und Hunde pathogen. Auch Rinder und Wasserbüffel sind empfänglich. Häufig verenden die Tiere ohne Behandlung, oder es kommt zu beträchtlichen Leistungseinbußen. Aus diesem Grund hat die Surra der Nutztiere in ihren hauptsächlichen Verbreitungsgebieten in Asien und Afrika große wirtschaftliche Bedeutung.

Die Seuchenbekämpfung konzentriert sich in erster Linie auf die Chemotherapie. Dafür stehen eine Reihe gut wirksamer trypanozider Verbindungen zur Verfügung.

Im Gegensatz hierzu sind die Möglichkeiten der Chemoprophylaxe, Vektorenkontrolle und insbesondere der Immunisierung sehr begrenzt.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Versuchen zur Immunisierung gegen die experimentelle T. evansi-Infektion bei Mäusen mit virulenzgeschwächten Erregermodifikationen und abgetöteten Parasiten.

2. IMMUNISIERUNG GEGEN DIE TRYPANOSOMIASIS UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER T. EVANSI-INFEKTION (anhand der Literatur)

Untersuchungen zur Immunisierung gegen die Trypanosomiasis liegen von zahlreichen Wissenschaftlern vor.
EHRLICH und SHIGA (1904) untersuchten die Immunität bei der Mal de Caderas, deren Erreger, T. equinum, ein naher Verwandter von T. evansi ist, nach Behandlung mit Farbentherapeutika der Benzopurpurinreihe und nachfolgender Belastungsinfektion. Sie beobachteten, abhängig vom Zeitpunkt zwischen Therapie und Belastungsinfektion, verlängerte Überlebenszeiten. Eine Erklärung dafür sahen die Autoren entweder in einer kurzzeitigen Immunität oder in der Residualwirkung der Therapeutika.

HALBERSTAEDTER (1905) erkannte, daß bei verschiedenen Trypanosomenarten keine Kreuzimmunität besteht. So waren z.B. Tiere, die von einer T. equinum-Infektion geheilt waren, voll empfänglich für T. equiperdum oder T. brucei. EHRLICH (1907) stellte fehlende Kreuzimmunität nicht nur bei verschiedenen Trypanosoma-Spezies, sondern auch bei verschiedenen Stämmen gemeinsamen Ursprungs fest.

TERRY (1911) untersuchte die therapeutische Wirksamkeit verschiedener trypanozider Substanzen, wie Trypanrot, Acetyl-atoxyl, Arsenophenylglycin u.a. bei T. brucei, T. equinum, T. equiperdum und bei 3 verschiedenen Stämmen von T. evansi. Nach der Heilung waren seine Versuchstiere für einige Zeit unempfänglich für eine erneute Infektion mit demselben Erreger. Er schrieb diesen Zustand entweder einer kurzfristigen Immunität oder der Wirkung von Medikamentenrückständen zu. Obwohl in einzelnen Phasen der Versuche Trypanosomen mikroskopisch nicht nachweisbar waren, ging der Verfasser davon aus, daß es sich um geringgradige Parasitämien handelte. Die Ergebnisse von HALBERSTAEDTER (1905) und EHRLICH (1907) hinsichtlich der fehlenden Kreuzimmunität bei verschiedenen Trypanosomen-Arten und bei verschiedenen Trypanosomen-Stämmen wurden von ihm bestätigt. So unterschied er beispielsweise Infektionen mit dem Erreger der Surra aus Indien von der Trypanosoma evansi-Infektion aus Mauritius. Es war ihm möglich, Versuchstiere, die mit einem der beiden Stämme infiziert und danach therapiert waren, erfolgreich mit dem anderen Stamm zu infizieren.

Er wies eine Immunität der Tiere nach der Behandlung mit Hilfe von Belastungsinfektionen nach. Als wichtigste Faktoren für die Intensivierung einer Immunität sah er die Wahl des Therapeutikums, des Parasitenstammes und des Zeitabstands zwischen Behandlung und Belastungsinfektion an.
Es gelang ihm außerdem die passive Immunisierung durch Serumübertragung von Tieren, die eine T. evansi-Infektion überlebt hatten. Weiterhin zeigten seine Versuche, daß sich in Tieren, die mit 2 verschiedenen T. evansi-Stämmen infiziert waren, eine Doppelimmunität gegen die beiden Erreger aufbaute.

BEVAN (1928) beschrieb, daß Rinder, die nach der Behandlung der Trypanosomiasis klinisch geheilt waren, zwar mit dem gleichen Erreger erfolgreich reinfiziert werden konnten, aber nicht mehr erkrankten. Er bezeichnete diesen Zustand als "tolerance". Diese Toleranz, die stets mit einer latenten Infektion verbunden war, konnte allerdings durch Stress oder Sekundärinfektionen zusammenbrechen, so daß die Tiere an Trypanosomiasis erkrankten (BEVAN, 1936).

Eine Reihe von Autoren führten immunologische Untersuchungen auch im Hinblick auf die Entwicklung einer Lebend- oder Totvakzine durch. STUBBS et al. (1958) ließen zur Virulenzabschwächung auf T. equiperdum Röntgenstrahlen einwirken. Die auf diese Weise behandelten Trypanosomen schienen jedoch für die Gewinnung einer Vakzine wenig geeignet zu sein.
Bessere Ergebnisse erzielten DUXBURRY und SADUN (1969), DUXBURRY et al. (1972) und WELLDE et al. (1975) bei der Bestrahlung von T. rhodesiense mit gamma-Strahlen. Es gelang ihnen, die biologischen Eigenschaften der Parasiten soweit zu verändern, daß sie zwar noch beweglich waren, sich aber nicht mehr im Wirt vermehrten. Mäuse und Ratten konnten mit den Trypanosomen nach 2- und 3maliger Verabreichung vollständig, nach einmaliger Verabreichung unvollständig geschützt werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten DUXBURRY et al. (1972) auch bei Affen. Bei Rindern war eine Schutzwirkung durch gamma-bestrahlte T. rhodesiense bis zu 14 Monate lang nachweisbar (WELLDE et al., 1973).

JAMES (1973) bestrahlte Suspensionen von T. brucei mit gamma-Strahlen. Die Parasiten konnten soweit abgeschwächt werden, daß einmalige Infektionen bei Ratten verlängerte Überlebenszeiten, 3 oder mehr Verabreichungen sogar völlige Immunität gegen eine Belastungsinfektion mit nicht bestrahlten Parasiten bewirkten.

Als weitere Möglichkeit zur Immunisierung wurden abgetötete Parasiten verwendet. SOLTYS und SMITH (1963) führten mit einer Totvakzine von T. brucei bei Kaninchen, Ratten und Schafen Versuche durch. Um eine Depotwirkung der Vakzine und damit eine fortgesetzte antigene Stimmulation zu bewirken, wurden die mit Formalin abgetöteten Parasiten mit einem öligen Zusatz emulgiert. Bei Ratten und Kaninchen wurden damit gute, bei Schafen aber enttäuschende Ergebnisse erzielt. Weitere Untersuchungen von SOLTYS (1964) mit T. brucei ergaben, daß der zur Vakzinierung verwendete Parasitenstamm, die Methode des Abtötens und die Dosierung des Inokulums eine entscheidende Rolle spielen. Die Inaktivierung durch Formalin oder durch Einfrieren und Wiederauftauen zeigte bessere Ergebnisse als eine Inaktivierung durch Erhitzen. Weiterhin erbrachten die Arbeiten von SOLTYS (1964), daß die fraktionierte Verabreichung einer bestimmten Vakzinedosis eine bessere Schutzwirkung erzielte, als eine einmalige Vakzinierung. Auch der Zusatz von Freund'schem Adjuvans führte zu einer Verbesserung der Vakzinewirkung.

An die Erfahrungen von LOGRIPPO und HARTMAN (1955) bei der Virusinaktivierung anknüpfend, erzielte SOLTYS (1967) bei der Verwendung von β-Propiolacton zur Abtötung von T. brucei wesentlich bessere Ergebnisse als mit allen bislang verwendeten Methoden. Das Mittel zeichnete sich dadurch aus, daß die Inaktivierung rasch, schonend und ohne hohe Verluste der protektogenen Eigenschaften stattfand. In Vergleichsuntersuchungen wies SOLTYS nach, daß diese Methode den herkömmlichen Möglichkeiten, wie Formalin, Phenol, Erhitzen oder Lösen in Aqua dest. überlegen war.
Auch bei der T. cruzi-Infektion wurden Versuche zur Vakzinierung mit abgetöteten Parasiten durchgeführt. GONZALEZ CAPPA et al. (1968) stellten Antigen aus Kulturformen von T. cruzi unter Druck her. Bei

Mäusen wurde damit eine Überlebensrate zwischen 88% und 100%, abhängig von der Anzahl der Injektionen und Menge des T. cruzi-Antigens, erreicht. GONZALEZ CAPPA et al. (1974) berichteten sogar von Kreuzimmunität bei Verwendung von verschiedenen T. cruzi-Stämmen. Auch NEAL und JOHNSON (1977) arbeiteten mit abgetöteten T. cruzi-Erregern. Sie verwendeten 0,05-0,1% Formalin, B-Propiolacton, Ultraschall, Gefriertrocknung und Einfrieren und Wiederauftauen. Zusätzlich benutzten sie Saponin SPL als Adjuvans. Die erzielte Immunität hielt bis zu 12 Wochen an, sowohl gegen homologe als auch gegen heterologe Stämme.

RYU (1975) führte Immunisierungsversuche mit T. evansi durch, wobei die Parasiten in verschiedenen Medien abgetötet wurden. Dabei erwiesen sich einzelne Lösungen, wie z.B. phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) und Lugol'sche Lösung als gut geeignet für Versuche dieser Art. Die Wirksamkeit der mit PBS abgetöteten Parasiten als Vakzine hing von der Antigenität des Stammes und dem Zeitraum zwischen Immunisierung und Belastungsinfektion ab. Bei der Mehrzahl der verwendeten Parasitenstämme erzielte der Autor mit einer mehrmaligen Verabreichung der Vakzine die besten Ergebnisse.

Mit Versuchen zur passiven Immunisierung gegen verschiedene Trypanosomen-Arten beschäftigten sich TERRY (1911), SEED (1963), SEED und GAM (1966), HERBERT und MACADAM (1971), HERBERT und LUMSDEN (1968), DUXBURRY et al. (1974), MCHARDY (1977, 1978).
Die Untersuchungen wurden in der Regel mit Hochimmunserum durchgeführt, mit sehr unterschiedlichen Resultaten je nach Tierart und verwendeter Parasitenspezies. MCHARDY (1977) immunisierte Mäuse gegen T. cruzi mit homologen Rekonvaleszentenserum und erzielte damit eine gute Wirkung. Weniger erfolgreich schützte Serum von Tieren, die mit abgetöteten Parasiten behandelt waren. HERBERT und MACADAM (1971) erreichten eine Schutzwirkung mit löslichem Exoantigen und DUXBURRY et al. (1974) immunisierten Mäuse durch Verabreichung von Stoffwechselprodukten von T. rhodesiense.
Die chemoprophylaktische und chemotherapeutische Wirksamkeit von Berenil^{R} und anderen Trypanoziden gegen verschiedene Trypanosomen-Arten wurden von zahlreichen Autoren abgehandelt.

Mit der direkten Einwirkung von Berenil^{R} auf den Parasiten beschäftigte sich JAMES (1976). Sie ging von der bisher praktizierten Methode, den Wirt mit Berenil zu behandeln, ab und badete stattdessen die Parasiten, T. brucei und T. congolense, in verschiedenen Konzentrationen von Berenil. Dabei wurden die Einwirkungszeiten so bemessen, daß die Parasiten nicht abgetötet waren. Bei den Versuchstieren erzielte sie mit diesen Trypanosomen eine gute Immunität. Dabei war die Trypanozidkonzentration so gering, daß die Rückstandsfrage keine Rolle spielte.
HUNGERER et al. (1976) schrieben, daß Substanzen, die die Zellvermehrung zu inkubieren vermögen, auch einen starken Einfluß auf die Vermehrungsfähigkeit in vitro und in vivo von Kulturformen von T. cruzi haben. Der Einfluß ist dosis- und zeitabhängig. Bei der Herstellung von Vakzine kommt es darauf an, die Vermehrungsfähigkeit des Parasiten zu unterdrücken, seine protektogenen Eigenschaften jedoch voll zu erhalten. Dies hängt vor allem von einer richtigen Bemessung der Einwirkungszeiten und der Konzentrationen des Inhibitors ab. HUNGERER et al. (1976) erzielten mit Ethidiumbromid, das die de novo-Synthese von DNA und RNA blockiert, die besten Erfolge. Eine Belastungsinfektion mit $5x10^{5}$ Parasiten wurde von den immunisierten Mäusen symptomfrei toleriert, die Kontrolltiere verendeten nach 12-15 Tagen.

Einige Autoren versuchten, mehrere Antigen-Typen in einer Vakzine unterzubringen. HERBERT und LUMSDEN (1968) hatten Antigen von drei verschiedenen Trypanosomen-Stämmen der Brucei-Gruppe in ihrer Vakzine aus formalinabgetöteten Parasiten verwendet. Die Schutzwirkung war gut bei Belastungsinfektionen mit diesen drei Stämmen, versagte aber bei einem heterologen vierten Stamm.
SCOTT und Mitarb. (1978) versuchten ebenfalls in einer "multistabilate vaccine" verschiedene Antigen-Typen von T. congolense unterzubringen. Sie erreichten aber selbst gegen homologe Belastungsinfektionen nur unvollkommenen Schutz.

CLARKSON (1976), TERRY (1976), MURRAY und URQUHART (1977) und HOLMES (1980) faßten in ihren Berichten über die Immunität bei der Trypanosomiasis die bisher geleisteten Arbeiten, die Ergebnisse und vor

allem die Problematik der Bekämpfung dieser Parasitose zusammen. Die Wissenschaftler sahen als Hauptschwierigkeit bei der gezielten Bekämpfung von Trypanosomen deren Fähigkeit an, die Oberflächenantigenität während des Infektionsverlaufs zu verändern. Diese "antigenic variation" stellte nach Ansicht von MURRAY und URQUHART (1977) ein fast unlösbares Hindernis bei der Entwicklung einer wirkungsvollen Vakzine dar. Andere Methoden zur Bekämpfung, wie Resistenzsteigerung durch Immunstimmulans, Verbesserung der Vektorenbekämpfung, Züchtung trypanotoleranter Haustierrassen und intensive Forschung auf dem Gebiet der Chemotherapie und Chemoprophylaxe werden als unerläßlich angesehen.

Zur Serodiagnostik von Trypanosomeninfektionen wurde neben anderen serologischen Methoden, wie der Immunfluoreszenz, der passiven Hämagglutination, der Komplementbindungsreaktion und dem Präzipitationstest, von einigen Autoren auch der Enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA) zum Nachweis von Antikörpern gegen Trypanosomen eingesetzt. Diesen von ENGVALL und PERLMANN (1972) entwickelten Immun-Enzym-Test verwendeten VAN KNAPPEN, BUYS und RUITENBERG (1977), VOLLER (1977), LUCKINS (1977) und LUCKINS und MEHLITZ (1978) zur Untersuchung der Antikörperbildung bei Mensch und Tier im Verlauf einer Infektion mit afrikanischen Trypanosomen, wie T. brucei, T. congolense, T. gambiense und T. rhodesiense. Als Antigene wurden wässrige Extrakte von Trypanosomen benutzt, die nach Reinigung von Blutbestandteilen und nach Zerstörung der Parasiten durch Ultraschall gewonnen worden waren. Antikörper gegen Trypanosomen waren mit dem ELISA sowohl im homologen als auch im heterologen System nachweisbar, seine Empfindlichkeit war der der Immunfluoreszenz vergleichbar, wenn nicht gar überlegen. Antikörper gegen Leishmanien zeigten Kreuzreaktionen mit dem Trypanosomen-Antigen. Frühestens am 8. Tag p.i. konnten mit dem ELISA Antikörper gegen Trypanosomen festgestellt werden. LUCKINS (1977) konnte mit diesem Test zwischen 84% und 92% der infizierten Zeburinder ermitteln. LUCKINS, GRAY und RAE (1978) verglichen den diagnostischen Wert von Serumglobulinspiegel, ELISA und IFAT bei der chronischen T. evansi-Infektion des Kaninchens. Die

Tiere zeigten ab dem 15. Tag p.i. bis zum 30. bzw. 37. Tag p.i. einen ansteigenden Verlauf der Antikörper-Titerkurve. Nach einer Behandlung der Kaninchen mit Suramin® am 29. Tag p.i. konnten selbst 118 Tage später noch spezifische Antikörper gegen T. evansi im Vergleich zum Ausgangswert festgestellt werden. Einen klaren Anhalt über eine erfolgreiche Therapie oder aber den latenten Verlauf einer Trypanosomen-Infektion gab allein die Bestimmung des IgM-Serumspiegels.
Bei vergleichbarer Aussagekraft hinsichtlich des Nachweises von Serumantikörpern gegen Trypanosomen hatte der ELISA gegenüber den anderen Methoden den Vorteil, daß sowohl visuell ohne großen technischen Aufwand, als auch, falls erforderlich, photometrisch objektiv die Ergebnisse ermittelt werden konnten.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

Parasiten

Es wurde der von DENNIG, 1975 auf Bali/Indonesien aus einem Rind isolierte T. evansi, Stamm Bali verwendet. Er wird seitdem im Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie auf Mäusen, Ratten, Hamster, Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen, Hunden und Ziegen passagiert. Für Mäuse ist dieser Stamm hochvirulent mit einer Überlebenszeit der Tiere von 5-8 Tagen.

Bei der Variante Bali handelt es sich um einen weniger virulenten Parasiten, der aus einer Maus nach Behandlung einer akuten T. evansi, Stamm Bali-Infektion mit hoher Dosierung von Berenil^{R} isoliert wurde. Der Parasit wird seitdem auf Mäusen gehalten.

Als zweiter Parasitenstamm wurde ein in Ägypten aus einem Kamel isolierter Stamm von T. evansi verwendet. Der Ausgangsstamm, T. evansi, Stamm Kairo, weist für Mäuse eine schwache Virulenz auf. Mit zunehmender Zahl der Mäusepassagen wird die Virulenz gesteigert und führt nach ca. 30-40 Passagen zu einer Mortalität von 100%. Die Parasiten von T. evansi, "Kairo Passage" töteten alle Mäuse nach 6-8 Tagen.

Versuchstiere:

Es wurden männliche und weibliche Mäuse (NMRI-Stamm Hannover) aus institutseigener Zucht im Alter von 6-8 Wochen und mit einem Gewicht von 30-40 g verwendet. Während der Experimente wurde auf gleichbleibende Bedingungen, d.h. durchschnittliche Raumtemperatur 22°C, relative Luftfeuchtigkeit 40-50%, standardisierte Fütterung mit "altromin"-Mäusediät (Fa. Altrogge, Lage/Lippe) und Wasser ad libitum, geachtet. Die Tiere wurden in Gruppen zu maximal 25 Mäusen in Makrolonkäfigen gehalten.

Chemische Substanzen:

Berenil^{R} (4,4'-Diamidino-diazoaminobenzol-diaceturat; Fa. Hoechst, Frankfurt/M.) kam unter Berücksichtigung der wirksamen Substanz, bezogen auf die therapeutische Dosis pro kg KGW zur Anwendung.

Die Lösung wurde mit BSG-Pufferlösung (Bicine buffered saline-glucose, pH 8,0) nach TAYLOR, LANHAM und WILLIAMS (1974) für jeden Versuch frisch zubereitet.

Zur Verhinderung der Blutgerinnung und zum Abtöten von Parasiten wurden Röhrchen, beschichtet mit EDTA di-Kalium (Fa. Greiner und Söhne, Nürtingen) verwendet. Dem Vollblut wurde als Antikoagulans Vetren^{R} (Fa. Promonta, Hamburg) zugesetzt.

Zum Abtöten der Parasiten auf eine für die immunogenen Eigenschaften möglichst schonende Art wurde ß-Propiolacton, reinst (Fa. Serva, Heidelberg) in 0,1%iger Lösung verwendet (ß-Propiolacton = 3-Hydroxypropionolacton $C_3H_4O_2$).

Bei operativen Eingriffen wurden die Mäuse mit Nembutal^{R} (Fa. Abbott, Ingelheim) - 60 mg Pentobarbital Natrium pro ml Lösung - in folgender Verdünnung narkotisiert: 2 Tropfen Nembutal + 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung pro Maus i.p.

Behandlung der Parasiten

- in Vollblut

Von Mäusen mit einer starken Parasitämie (ca. 50 000 Trypanosomen pro mm^3 Blut) wurden 0,05 ml Blut (ca. 25 000 Parasiten) in 5 ml Berenil-BSG-Lösung gegeben und bei 37°C inkubiert.

Die Einwirkungszeiten wurden so gewählt, daß die Parasiten zwar in ihrer Virulenz abgeschwächt, aber nicht abgetötet wurden. Die Zeiten betrugen zwischen 5 und 210 Minuten.

Die Konzentrationen von Berenil in den verschiedenen Lösungen betrugen 35; 25; 15; 14; 10; 5; 3,5 und 0,35 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Puffer.

- isolierte Parasiten

Trypanosomen wurden nach der Methode von LANHAM (1968) von Blutbestandteilen getrennt. Eine Säule wurde mit equilibrierter DEAE-Sephadex-A 50-Cellulose (Pharmacia, Uppsala) beschichtet und mit einem Gemisch aus parasitiertem Blut und BSG-Puffer im Verhältnis 1:2 beschickt. Nach der Isolierung wurden die Trypanosomen in Berenil-Konzentrationen von 3,5 und 0,35 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG bei

37°C inkubiert. Dabei enthielten 5 ml Berenil-BSG-Lösung ca. 13 000 000 Parasiten. Die Einwirkungszeit betrug bei der höheren Berenil-Konzentration 30 Minuten, bei der 10fachen Verdünnung 120 Minuten.

Abtöten der Parasiten

Hochparasitiertes Blut wurde 12 Stunden in mit EDTA di-Kalium beschichteten Röhrchen bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Nach dieser Zeit hatten die Trypanosomen keine Bewegungsaktivität mehr im Gegensatz zu Parasiten, die ebenfalls in Vollblut mit Vetren als Antikoagulans in unbeschichteten Röhrchen aufbewahrt waren.

Trypanosomen wurden nach der Methode von LANHAM (1968) von Blutbestandteilen getrennt und in einer 0,1%igen Lösung von ß-Propiolacton unter Verwendung von BSG-Puffer 90 Minuten bei -4°C inkubiert. Danach war keine Bewegungsaktivität mehr feststellbar.
1 ml ß-Propiolacton-BSG-Lösung enthielt ca. 2 500 000 Parasiten.

Inokula

Die Versuchstiere wurden entweder mit stark parasitiertem Vollblut in unterschiedlicher Dosierung oder mit Parasitensuspensionen, bestehend aus parasitiertem Vollblut und BSG-Puffer bzw. parasitiertem Vollblut und Berenil-BSG-Lösung, i.p. infiziert.
Isolierte Parasiten wurden ebenfalls in BSG-Puffer bzw. Berenil-BSG-Lösung i.p. verabreicht.
Die mit ß-Propiolacton abgetöteten Trypanosomen kamen in dem 0,1%igen Gemisch aus ß-Propiolacton und BSG mit isolierten abgetöteten Parasiten zur Anwendung.

Bei der Übertragung geringer Parasitenmengen (ca. 50 Trypanosomen pro Maus) wurde unter Nembutal-Narkose durch eine Inzision in die Bauchdecke i.p. infiziert. Exakte Parasitenmengen in BSG-Puffer wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette direkt in die Bauchhöhle injiziert.

Zur Infektion mit behandelten Parasiten aus Vollblut wurden pro Maus jeweils 0,1 ml Parasitensuspension pro 10 g KGW i.p. verabreicht. Dabei wurden pro Maus ca. 1 500 Parasiten übertragen, gleichzeitig

mit Berenil in der Dosierung (je nach Konzentration der Berenil-BSG-Lösung) von 3,5 (therapeutische Dosis); 2,5; 1,5; 1,4 (2/5 therapeutische Dosis); 1,0; 0,5; 0,35 (1/10 therapeutische Dosis) und 0,035 mg (1/100 therapeutische Dosis) Wirksubstanz pro kg KGW.

Die Kontrolltiere erhielten ebenfalls ca. 1 500 Parasiten i.p., die jedoch nur in BSG-Puffer mit derselben Einwirkungszeit inkubiert waren.

Bei der Infektion mit behandelten, isolierten Parasiten wurden pro Maus 0,1 ml Parasitensuspension pro 10 g KGW i.p. verabreicht. Jedem Tier wurden damit ca. 750 000 Parasiten und Berenil in der Dosierung von 0,35 bzw. 0,035 mg Wirksubstanz pro kg KGW injiziert.

Im Kontrollversuch wurden die Mäuse mit derselben Parasitenzahl infiziert. Jedoch waren diese Trypanosomen bei gleicher Einwirkungszeit lediglich in BSG-Puffer inkubiert.

Die Zahl der Parasiten im Inokulum wurde, ebenso wie bei der quantitativen Bestimmung von Parasitenmengen im Verlauf der Untersuchungen, durch Auszählen in der THOMA-Kammer bestimmt. Dazu wurden 0,001 ml des parasitierten Blutes bzw. der Parasitensuspension mit physiologischer Kochsalzlösung und Trypanosomenzählflüssigkeit nach MÜHLPFORDT (1964) versetzt und in der Zählkammer nach THOMA ausgezählt.

Kontrolle des Infektionsverlaufs

Die Parasitämie der Versuchstiere wurde entweder im Nativpräparat oder nach Zentrifugation des Blutes in Mikrohämatokrit-Kapillaren (Methode von WOO, 1969) nachgewiesen.
Für die Untersuchungen wurde peripheres Blut aus der Schwanzspitze bzw. aus dem retroorbitalen Venenplexus (Methode nach NOELLER, 1955) entnommen. Die Beurteilung der Parasitämie im Nativblut erfolgte nach folgendem Schema:

Nativpräparat (Untersuchung von 50 Gesichtsfeldern bei 500 x Vergrößerung)

-	:	keine Trypanosomen in 50 Gesichtsfeldern (GF)
(+)	:	1-3 Trypanosomen in 50 Gesichtsfeldern
1+	:	1 Trypanosoma in 10 Gesichtsfeldern
2+	:	1 Trypanosoma pro GF 5 000 T. pro mm^3 Blut
3+	:	2-5 Trypanosomen pro GF 5 000 T. pro mm^3 Blut
4+	:	5-50 Trypanosomen pro GF 5 000-50 000 T. pro mm^3 Blut
5+	:	50 Trypanosomen pro GF 50 000 T. pro mm^3 Blut

Methode nach WOO (1969) Vergrößerung 125 x bzw. 500 x

-	:	keine Trypanosomen pro Kapillare
1+	:	1-10 Trypanosomen pro Kapillare
2+	:	10-50 Trypanosomen pro Kapillare
3+	:	50-100 Trypanosomen pro Kapillare
4+	:	massenhaft

Die Beobachtungszeit für den Verlauf der Infektion betrug 90 Tage p.i. bzw. nach der Belastungsinfektion.

Färbung

Die Ausstriche von Nativblut bzw. von Parasiten-Berenil-Suspensionen wurden in der von der Firma angegebenen Weise nach Giemsa (Farblösung von Merck AG, Darmstadt) gefärbt.

Serologische Methodik

Für die Bestimmung der Titerverlaufskurve wurden 2 Versuchstiergruppen mit je 20 Mäusen und eine Gruppe mit 25 Mäusen ausgewählt. Die erste Gruppe war mit Parasiten von T. evansi, Stamm Bali infiziert, die nach der Isolierung von Blutbestandteilen 30 Minuten lang einer Berenil-Konzentration von 3,5 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG ausgesetzt waren. Die zweite Gruppe war ebenfalls mit Berenil-behandelten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali infiziert (Einwirkungszeit: 120 Minuten, Konzentration des Berenils 0,35 mg pro 100 ml BSG).

Die dritte Gruppe mit 25 Versuchstieren hatte mit ß-Propiolacton abgetötete Parasiten von T. evansi, Stamm Bali erhalten. Alle Tiere wurden am 35. Tag p.i. mit je 500 virulenten Parasiten des T. evansi, Stamm Bali einer Belastungsinfektion ausgesetzt.

Zur Serumgewinnung wurden mindestens 2 Tiere geblutet, bis ein Quantum von ca. 1 ml Vollblut gewonnen war. Um einen möglichst exakten Kurvenverlauf zu erhalten, wurde zwischen dem 2. und 31. Tag p.i. im Abstand von 2-3 Tagen, danach bis zum 50. Tag p.i. mindestens 1mal wöchentlich Blut entnommen. Nach dem Zentrifugieren des Vollbluts (10 Min. mit 1 800 x g) wurde das Serum abgezogen und bis zur Verwendung tiefgefroren.

Den Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA) führte ich entsprechend der von REIF (1980) beschriebenen Technik zum Antikörper-Nachweis gegen Babesia divergens beim Rind durch.

Die Eiweißkonzentration meines T. evansi-Rohantigens, das ich nach Isolierung der Parasiten, ihrer Zerstörung durch Ultraschall und Extraktion im wässrigen Milieu gewonnen hatte, betrug 40 ug/ml. 0,05 ml dieser Antigenlösung in Phosphatpuffer (pH 7,2) wurde in jede Kavität der Microtiter^{R}-Platte einpipettiert, bei 37^{o}C 3 Stunden lang auf einem Taumelgerät inkubiert, über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag mit Leitungswasser ausgewaschen. Dann wurden jeweils 0,025 ml Serum und 0,075 ml 0,5%iges Rinderalbumin in Phosphatpuffer (pH 7,2) zur Vermeidung unspezifischer Anlagerungen von Serumglobulin an die Polystyrolwände einpipettiert.

Mit dem Mikrodiluter wurde eine Serumverdünnungsreihe von 1:4, 1:8, 1:16 bis 1:4096 hergestellt, die Platten wurden für die Antigen-Antikörper-Reaktion erneut bei 37^{o}C auf dem Taumelgerät 1 Stunde inkubiert und danach mit Leitungswasser ausgewaschen.

Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Komplexe verwendete ich ein mit Peroxydase gekoppeltes Antiglobulin (Anti-Maus-Ig, Institut Pasteur), das mit 4%igem Rinderalbumin in Phosphatpuffer zur Verhinderung von unspezifischen Anlagerungen an die Polystyrolwände zum Gebrauch 1:100 verdünnt worden war. 0,05 ml dieser Suspension wurden in jede Kavität einpipettiert und erneut 60 Minuten bei 37^{o}C auf dem Taumelgerät inkubiert und ausgewaschen. Mit der anschließenden Zugabe von Substrat

(0,08%ige Amino-Salicylsäure und 0,05%iges Wasserstoffperoxyd im Verhältnis 1:10) wurde eine Reaktion mit brauner bis violetter Färbung erzielt, die nach einer Stunde mit je 0,05 ml 1 N NaOH abgestoppt und visuell und photometrisch mit einem Titertek^{R}-Multiskan bei 405 nm sowohl vor als auch nach der Zugabe von NaOH abgelesen wurde.

3.2 Versuche und Ergebnisse

3.2.1. Untersuchungen zur Immunisierung mit schwach virulenten Parasiten (T. evansi, Variante Bali; T. evansi, Stamm Kairo) gegen virulente Parasiten von T. evansi (T. evansi, Stamm Bali; T. evansi, "Kairo Passage")

In dieser Versuchsreihe wurden 60 Mäuse mit der Variante Bali und 60 Mäuse mit dem Stamm Kairo infiziert. Zur Prüfung der Immunität erfolgte nach unterschiedlichen Zeitabständen eine Belastung dieser Mäuse mit dem hochvirulenten Stamm Bali bzw. der "Kairo Passage" mit ihrer gesteigerten Virulenz in unterschiedlich starken Inokula.

Kreuzversuch Stamm Kairo - Stamm Bali

Bei einer Belastungsinfektion mit ca. 500 bzw. ca. 50 Parasiten vom Stamm Bali pro Maus zeigte sich folgendes Ergebnis (Tab. 1; Nr. 1, 2): Nach der Basisinfektion mit T. evansi, Stamm Kairo, bei der pro Maus ca. 100 Parasiten i.p. verabreicht wurden, entwickelten alle 40 Tiere am 2.-3. Tag p.i. eine schwache Parasitämie (Woo-Test 1+ bis 2+). Bei der Mehrzahl der Mäuse kam es in unterschiedlichen Zeitabständen nach dieser Basisinfektion zu einem schwachen bis starken Anstieg des Parasitenbefalls (Nativpräparat bis 5+), der anschließend nach 1-5 Tagen wieder absank.

Die Versuchstiere wurden am 98. (20 Mäuse mit je ca. 500 Parasiten) bzw. am 92. Tag p.i. (20 Mäuse mit je ca. 50 Parasiten) belastet. Es entwickelte sich bei allen Tieren, mit einer Ausnahme, eine rasch ansteigende, starke Parasitämie, die 6-46 Tage nach der Belastungsinfektion zum Tode führte. Dabei war die durchschnittliche Überlebenszeit der Tiere, die mit je ca. 500 Parasiten belastet worden waren, 7 Tage (max. 13, min. 6 Tage), bei der Gruppe mit ca. 50 Parasiten pro Maus 17 Tage (max. 46, min. 6 Tage). Eine mit ca. 50 Parasiten belastete Maus entwickelte keine Parasitämie und überlebte die Beobachtungszeit von 90 Tagen nach der Belastungsinfektion symptomfrei. Die Überlebenszeit der jeweils 5 Kontrollmäuse betrug bei der Infektion mit ca. 500 Parasiten pro Maus 6-12 Tage, bei ca. 50 Parasiten pro Maus 8-16 Tage.

Kreuzversuch Stamm Kairo - "Kairo Passage"

Bei einer Belastungsinfektion mit ca. 50 Parasiten ergab sich folgendes Resultat (Tab. 1; Nr. 3):
Nach der Basisinfektion mit T. evansi, Stamm Kairo, bei der pro Maus ca. 100 Parasiten i.p. verabreicht wurden, entwickelten alle 20 Mäuse am 2.-6. Tag p.i. eine schwache Parasitämie (Woo-Test 1+ bis 3+). Am 9. Tag p.i. zeigte keines der Tiere einen mikroskopisch nachweisbaren Parasitenbefall. In der darauffolgenden Zeit bis zur Belastungsinfektion am 93. Tag p.i. wurden bei keiner Maus klinische Krankheitssymptome beobachtet und auch mikroskopisch konnten keine Parasiten nachgewiesen werden.
Die Mäuse wurden am 93. Tag p.i. mit ca. 50 Parasiten von T. evansi, "Kairo Passage" pro Maus belastet. 5 Tage später zeigten 8 Tiere im Nativpräparat einen Parasitenbefall in der Höhe zwischen (+) und 3+. 17 Tage nach der Belastungsinfektion verendeten 4 Mäuse, 39 Tage nach der Belastungsinfektion eine Maus. Daraus ergibt sich für die verendeten Tiere eine durchschnittliche Überlebenszeit von 21 Tagen.
15 Tiere zeigten in der Beobachtungszeit von 90 Tagen weder klinische Krankheitssymptome noch mikroskopisch eine Parasitämie.
Die Überlebenszeit der 5 Kontrollmäuse betrug durchschnittlich 15 Tage (max. 19, min. 11 Tage).

Kreuzversuch Variante Bali - "Kairo Passage"

Bei einer Belastungsinfektion mit ca. 50 bzw. ca. 500 Parasiten von der "Kairo-Passage" pro Maus wurden folgende Resultate erzielt (Tab. 1; Nr. 4, 6):
40 Mäuse erhielten als Basisinfektion ein Inokulum von ca. 500 Parasiten der Variante Bali. Am 5. Tag p.i. entwickelten alle Tiere eine geringgradige Parasitämie (Woo-Test 1+ bis 3+). Am 11. Tag p.i. konnte bei allen Versuchstieren, mit einer Ausnahme, kein Parasitenbefall mikroskopisch festgestellt werden. Diese eine Maus zeigte im Woo-Test eine Befallshöhe von 1+ und 2 Tage später konnte auch bei diesem Tier keine Parasitämie mehr beobachtet werden. Während der Zeit bis zur Belastungsinfektion waren alle Versuchstiere bei den mikroskopischen Kontrolluntersuchungen des Blutes mit Hilfe des Nativpräparats und

des Woo-Tests frei von Parasiten. Die Belastungsinfektion wurde am 46. Tag (Inokulum ca. 50 Parasiten pro Maus) bzw. am 146. Tag (Inokulum ca. 500 Parasiten pro Maus) p.i. vorgenommen.
Bei 35 von 40 Versuchstieren entwickelte sich eine ansteigende Parasitämie, die den Tod der Tiere nach 9-63 Tagen zur Folge hatte. Die durchschnittliche Überlebenszeit der mit ca. 50 Parasiten pro Maus belasteten Tiere betrug 18 (max. 31, min. 9 Tage), der mit ca. 500 Parasiten pro Maus belasteten Tiere betrug 34 Tage p.i. (max. 63, min. 10 Tage). Aus der Versuchsgruppe, die mit ca. 50 Parasiten pro Maus belastet wurden, überlebten 5 von 20 Tieren in der folgenden Beobachtungszeit von 90 Tagen symptomfrei und ohne mikroskopisch nachweisbare Parasitämie.
Die Überlebenszeit der jeweils 5 Kontrollmäuse betrug durchschnittlich 11 Tage (max. 14, min. 9 Tage).

Kreuzversuch Variante Bali - Stamm Bali

Bei einer Belastungsinfektion mit ca. 500 Parasiten vom Stamm Bali pro Maus zeigte sich folgendes Ergebnis (Tab. 1; Nr. 5):
Alle 20 Versuchstiere zeigten nach der Basisinfektion mit ca. 500 T. evansi, Variante Bali zwischen dem 5. und 7. Tag p.i. eine schwache Parasitämie (Woo-Test +1 bis 3+). Am 10. Tag p.i. kam es bei 4 Mäusen zu einem Parasitenbefall in der Höhe von (+) im Nativpräparat, der nach 3 Tagen wieder absank. Bis zur Belastungsinfektion am 68. Tag p.i. zeigte keine Maus eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie.
Am 68. Tag p.i. erfolgte die Belastungsinfektion mit ca. 500 Parasiten von T. evansi pro Maus. 8 Tage später verendeten 3 Tiere nach rasch ansteigender, starker Parasitämie. 14 Mäuse zeigten im Woo-Test einen schwachen Parasitenbefall von 1+ bis 3+, 3 Tiere waren ohne nachweisbare Parasitämie. In der darauffolgenden Beobachtungszeit von 90 Tagen zeigte keine der Mäuse einen mikroskopisch nachweisbaren Parasitenbefall oder klinische Krankheitssymptome, mit Ausnahme von 2 Tieren, die am 23. bzw. 45. Tag nach der Belastungsinfektion interkurrent verendeten. Die Überlebenszeit der im Versuch verendeten Tiere (ausschließlich der interkurrenten Fälle) betrug 8 Tage. Die Überlebenszeit der 5 Kontrollmäuse betrug 6 bzw. 7 Tage.

Tab. 1: Untersuchungen zur Immunisierung mit schwach virulenten Parasiten gegen virulente Parasiten von T. evansi

Versuch	Kreuzinfektion	Belastungsinfektion Tage p.i.	Belastungsinfektion Parasitenzahl/Maus	Verhältnis überlebd.Tiere/ belastete Tiere	Durchschnittl. Überlebenszeit Tage n. Belastg.	Verhältnis überlebd. Kontrolltiere Kontrollt.ges.	Überlebenszeit d. Kontrolltiere Tage p.i.
1	Stamm Kairo Stamm Bali	98	500^{+}	0/20	7	0/5	6-12
2	Stamm Kairo Stamm Bali	92	50^{+}	1/20	17	0/5	8-16
3	Stamm Kairo "Kairo Passage"	93	50^{++}	15/20	21	0/5	11-19
4	Variante Bali "Kairo Passage"	46	50^{++}	5/20	18	0/5	9-14
5	Variante Bali Stamm Bali	68	500^{+}	15/20	8	0/5	6-7
6	Variante Bali "Kairo Passage"	146	500^{++}	0/20	34	0/5	9-14

Anmerkung: $^{+}$Stamm Bali

$^{++}$"Kairo Passage"

3.2.2. Abschwächung von T. evansi, Stamm Bali durch direkte Einwirkung von Berenil®

Lebende, virulente Parasiten vom Stamm Bali wurden in vitro einer Berenil-BSG-Lösung ausgesetzt. Im Vorversuch zeigten die Parasiten in einer Berenil-Konzentration von 35 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG nach 230 Minuten bei 37°C noch Bewegungsaktivität, die nach 300 Minuten nicht mehr nachweisbar war. Für meine Versuche sollten die Trypanosomen zwar in ihrer Virulenz abgeschwächt, aber nicht abgetötet werden. Deshalb wählte ich die Einwirkungszeiten der Berenil-BSG-Lösungen zwischen 5 und 210 Minuten.
Ca. 25 000 Parasiten in 0,05 ml Vollblut wurden in jeweils 5 ml Berenil-BSG-Lösung inkubiert. Die Berenil-Konzentrationen betrugen 35; 25; 15; 5; 3,5 und 0,35 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG.
Danach wurden die Parasiten auf Mäuse übertragen. Jede Maus wurde p.i. mit 0,1 ml der Parasitensuspension pro 10 g KGW infiziert. Damit erhielten die Tiere ca. 1 500 Parasiten pro Maus und Berenil in der Dosierung von 3,5; 2,5; 1,5; 0,5; 0,35 und 0,035 mg Wirksubstanz pro kg KGW. Die Beobachtungszeit betrug jeweils 90 Tage p.i..
Nach der Einwirkung von Berenil auf die Trypanosomen in vitro zeigten sich bei zahlreichen Parasiten im Lichtmikroskop morphologische Veränderungen. Schon nach einer Einwirkungszeit von 5 Minuten war eine so massive intraplasmatische Granulationsbildung zu beobachten, daß teilweise die Kinetoplasten der Trypanosomen nicht mehr zu erkennen waren. Nach längerer Einwirkungszeit von 30-120 Minuten stellten sich bei der Mehrzahl der Parasiten Geißelspaltung, Vakuolisierung des Kerns und Formveränderungen, wie Ballonierung, ein. Eine Gesetzmäßigkeit im Hinblick auf exakte Einwirkungszeit, Trypanozidkonzentration und prozentualen Anteil der veränderten Trypanosomen konnte nicht festgestellt werden.

3.2.2.1. Versuche mit verschiedenen Berenil-Konzentrationen

Die Trypanosomen vom Stamm Bali wurden 230 Minuten Berenil-Lösungen in der Konzentration von 35; 25; 15; 5 und 3,5 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt. Nach dieser langen Einwirkungszeit in den verschiedenen Berenil-Konzentrationen zeigte sich nach der Übertragung auf Mäuse bei keinem der Versuchstiere eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie und auch keine klinische Erkrankung. Trypanosomen, die 90, 60 und 30 Minuten lang Berenil-Konzentrationen von 3,5; 10 und 15 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt waren, riefen nach der Übertragung auf Mäuse ebenfalls weder Krankheitssymptome noch eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie hervor.

Wurden die Parasiten den verschiedenen Berenil-Lösungen nur 5 Minuten lang ausgesetzt und dann auf Versuchstiere übertragen, zeigte sich folgendes Resultat:

Bei Einwirkung einer Berenil-Konzentration von 3,5 mg pro 100 ml BSG-Lösung auf die Parasiten wurde bei 2 von 3 Tieren nach der Infektion eine ansteigende Parasitämie beobachtet, die nach 12 bzw. 16 Tagen zum Tode führte. Eine Maus überlebte, ohne klinisch zu erkranken und ohne nachweisbare Parasitämie.

In eine Berenil-Konzentration von 10 mg pro 100 ml BSG-Lösung verbrachte Trypanosomen erzeugten nach der Übertragung weder eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie noch klinische Symptome. Dagegen führten Parasiten, die nach dieser kurzen Einwirkungszeit in einer Berenil-Konzentration von 15 mg pro 100 ml BSG-Lösung übertragen wurden bei 1 von 3 Mäusen zu einer Parasitämie. 63 Tage p.i. verendete das Tier. Die beiden anderen Mäuse überlebten symptomfrei und ohne mikroskopisch nachweisbaren Parasitenbefall.

Für den Kontrollversuch wurde dieselbe Parasitenzahl verwendet. Jedoch wurde das parasitierte Blut bei gleicher Einwirkungszeit lediglich in BSG-Puffer bei 37°C inkubiert. Die jeweils 3 Kontrollmäuse verendeten nach 6 und 7 Tagen.

3.2.2.2. Versuche mit unterschiedlich langen Einwirkungszeiten der Berenil-BSG-Lösungen

Bei einer Einwirkungszeit von 5, 30, 60, 90 und 120 Minuten konnten Trypanosomen vom Stamm Bali, die einer Berenil-Konzentration von 35 mg pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt waren, nach der Übertragung bei den Versuchstieren weder klinische Krankheitssymptome noch eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie hervorrufen.
Nach Einwirkung einer geringeren Berenil-Konzentration von 3,5 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung zeigten die Versuche mit verschiedenen Einwirkungszeiten folgende Resultate:
Nach einer kurzen Einwirkung der Berenil-BSG-Lösung von 5 Minuten erzeugten die Parasiten nach der Übertragung bei den Versuchstieren regelmäßig am 2. Tag p.i. eine geringgradige Parasitämie (Woo-Test 1+). Während der übrigen Beobachtungszeit blieben die Mäuse symptomfrei und ohne mikroskopisch nachweisbaren Parasitenbefall.
Nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten verursachten die Parasiten nur noch bei 1 von 3 Mäusen am 2. Tag p.i. eine Parasitämie. Danach blieben alle Tiere während der Beobachtungszeit frei von Trypanosomen.

Die Übertragung von Parasiten, die 60 bzw. 90 Minuten der Berenil-Konzentration von 3,5 mg pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt waren, führte bei den Versuchstieren weder zu einer Erkrankung noch zu einem mikroskopisch nachweisbaren Parasitenbefall.
Wurden Trypanosomen einer Berenil-Konzentration von 0,35 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt, verliefen die Infektionen, je nach Dauer der Berenil-Einwirkung, wie folgt:
Nach einer Einwirkungszeit von 5 Minuten auf die Parasiten führte nach der Übertragung eine rasch ansteigende Parasitämie 17-19 Tage p.i. zum Tod der Mäuse.
Parasiten, die 30 Minuten der Berenil-BSG-Lösung ausgesetzt waren, riefen bei 2 von 3 Mäusen eine rasch ansteigende Parasitämie hervor, die nach 18 und 20 Tagen p.i. zum Tode führte. Eine Maus zeigte weder Krankheitssymptome noch eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie und überlebte.
Nach der Übertragung von Parasiten, die 60 Minuten der Berenil-Konzentration von 0,35 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt

waren, verlief die Infektion bei 2 von 3 Tieren nach 23 bzw. 47 Tagen tödlich. Eine Maus zeigte nur am 2. Tag p.i. eine schwache Parasitämie (Woo-Test 2+). Während der übrigen Beobachtungszeit erkrankte sie nicht und zeigte auch mikroskopisch keinen Parasitenbefall.
Nach 90 Minuten Einwirkungszeit riefen die Trypanosomen bei 2 von 3 Mäusen eine ansteigende Parasitämie hervor. Die Infektion verlief nach 21 bzw. 41 Tagen p.i. tödlich. Eine Maus zeigte zwar am 2. Tag p.i. geringgradigen Parasitenbefall (Woo-Test 1+), danach noch einmal am 73. Tag p.i. und am 75. Tag p.i. (Woo-Test 1+). Sie überlebte ohne klinische Erkrankung.
Bei einer Einwirkungszeit von 120 Minuten führte die Infektion mit den Trypanosomen zwar in unregelmäßigen Zeitabständen zu geringgradigen Parasitämien (Woo-Test 1+ und 2+) der Mäuse, jedoch erkrankten diese nicht klinisch.
Wurden die Parasiten 150 Minuten einer Berenil-Konzentration von 0,35 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt, so zeigten nach der Übertragung 3 von 8 Mäusen am 2. Tag p.i., 1 von 8 Mäusen nochmals am 32. Tag p.i. einen schwachen Parasitenbefall. Bei 5 von 8 Mäusen wurden zu keinem Zeitpunkt Trypanosomen im Blut mikroskopisch festgestellt. Nach einer Einwirkungszeit von 180 bzw. 210 Minuten zeigten die Versuchstiere keine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie mehr. Im Kontrollversuch wurde jeweils dieselbe Menge hochparasitiertes Blut mit ca. 25 000 Parasiten in BSG-Puffer ohne Berenil bei gleichen Einwirkungszeiten inkubiert und auf je 3 Mäuse übertragen (ca. 1 500 Parasiten pro Maus). Sie verendeten nach 6-9 Tagen p.i..

3.2.3. Immunisierung mit abgeschwächten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali

3.2.3.1. Immunisierung mit parasitiertem Vollblut und Passage-Versuche

0,05 ml hochparasitiertes Vollblut mit ca. 25 000 Parasiten von T. evansi, Stamm Bali wurde in jeweils 5 ml Berenil-BSG-Lösung bei 37°C inkubiert und auf Mäuse übertragen. Jedes Tier erhielt ein Inokulum von 0,1 ml Berenil-BSG-Parasiten-Gemisch pro 10 g KGW i.p. (ca. 1 500 Parasiten pro Maus).

Im Kontrollversuch wurden jeweils 5 Mäuse mit derselben Menge Parasiten vom Stamm Bali, die bei gleicher Einwirkungszeit statt in Berenil-BSG-Lösung nur in BSG-Lösung inkubiert waren, infiziert. Die immunisierende Wirkung der behandelten Parasiten wurde mit einer Belastungsinfektion von ca. 500 bzw. 5 000 virulenten Parasiten des Stammes Bali geprüft. Die Beobachtungszeit betrug 90 Tage nach der Belastungsinfektion.

Im einzelnen führte ich folgende Versuche durch:
Nach einer Einwirkungszeit von 5 Minuten in einer Berenil-BSG-Lösung mit der Konzentration von 14 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung wurden je 0,3 ml dieses Parasitengemisches auf 20 Mäuse übertragen. Die Tiere erhielten also als Basisinfektion ca. 1 500 Trypanosomen und 1,4 mg Berenil pro kg ^{KGW} i.p.. Am 2. Tag p.i. zeigten 18 von 20 Mäusen eine geringgradige Parasitämie (Woo-Test 1+ bis 2+); danach war lediglich ein Tier am 38. Tag p.i. noch einmal im Woo-Test positiv und verendete 2 Tage später. Eine Maus verendete interkurrent am 24. Tag p.i.. 2 Versuchstiere zeigten bis zur Belastungsinfektion mikroskopisch keinen Parasitenbefall.
18 der 20 Mäuse wurden am 42. Tag p.i. mit ca. 500 T. evansi, Stamm Bali belastet. Sie zeigten während der Beobachtungszeit weder Krankheitserscheinungen noch eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie. Im Kontrollversuch für die Basisinfektion verendeten die Mäuse nach 6-7 Tagen, für die Belastungsinfektion nach 9-10 Tagen (Tab. 2; Nr. 1)

Trypanosomen, die 5 Minuten einer Berenil-Konzentration von 3,5 mg pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt waren und auf 10 Mäuse übertragen wurden (je ca. 1 500 Parasiten und 0,35 mg Berenil pro kg KGW 1/10 therapeutische Dosis), erzeugten bei allen Mäusen am 2. Tag p.i. eine schwache Parasitämie (Woo-Test 3+). 7 Tiere waren danach bis zur Belastungsinfektion am 42. Tag p.i. ohne mikroskopisch nachweisbaren Parasitenbefall. Je ein Tier verendete am 28. und 42. Tag p.i. nach ansteigender Parasitämie.
Nach der Belastungsinfektion mit ca. 500 Parasiten pro Maus von T. evansi, Stamm Bali bei 7 Mäusen zeigte keines der Versuchstiere bis zum Ende der Beobachtungszeit Krankheitssymptome oder eine mikrosko-

pisch nachweisbare Parasitämie. Die Kontrolltiere der Basisinfektion und der Belastungsinfektion verendeten nach 6-7 bzw. 9-10 Tagen p.i. (Tab. 2; Nr. 2).

Nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten in einer Berenil-Konzentration von 3,5 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung auf Mäuse übertragene Parasiten (pro Maus ca. 1 500 Parasiten und eine Berenil-Dosis von 0,35 mg pro kg KGW) erzeugten bei 10 von 20 Mäusen am 2. Tag p.i. eine schwache Parasitämie (Woo-Test 1+ und 2+). Zwischen dem 8. und 31. Tag p.i. verendeten 3 von 20 Tieren. Ab dem 31. Tag p.i. zeigte eine Maus eine ansteigende Parasitämie.

Nach der Belastungsinfektion mit ca. 500 Trypanosomen vom Stamm Bali pro Maus am 34. Tag p.i. überlebten 16 Tiere ohne Krankheitserscheinungen oder mikroskopisch nachweisbaren Parasitenbefall bis zum Ende des Beobachtungszeitraums. Die Maus mit der ansteigenden Parasitämie ab dem 31. Tag p.i. verendete 10 Tage später, also am 7. Tag nach der Belastungsinfektion. Die Kontrolltiere zur Basisinfektion überlebten 6-8 Tage, die Kontrolltiere zur Belastungsinfektion 8-10 Tage (Tab. 2; Nr. 3).

Parasiten wurden 90 Minuten lang einer Berenil-Konzentration von 0,35 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt. Nach der Übertragung auf 20 Mäuse (pro Maus ca. 1 500 Parasiten und 0,035 mg Berenil pro kg KGW i.p.) zeigten 16 von 20 Mäusen zwischen dem 2. und 7. Tag p.i. eine schwache Parasitämie (Woo-Test 1+ bis 3+). 3 Tiere verendeten zwischen dem 21. und 28. Tag p.i.. 2 Mäuse zeigten eine ansteigende Parasitämie ab dem 38. Tag p.i.. 3 bzw. 4 Tage nach der Belastungsinfektion am 42. Tag p.i. (ca. 500 Parasiten pro Maus) verendeten die beiden Mäuse mit ansteigender Parasitämie. Zwei weitere Tiere zeigten 9 Tage nach der Belastungsinfektion Trypanosomen im Blut und verendeten 4 bzw. 26 Tage später. Bei 13 Mäusen waren bis zum Ende der Beobachtungszeit weder klinische Symptome noch Parasiten nachweisbar.

Die Kontrollen zur Basisinfektion verendeten nach 6-10 Tagen, die Kontrollen zur Belastungsinfektion nach 9-10 Tagen (Tab. 2; Nr. 4).

Trypanosomen vom Stamm Bali wurden 120 Minuten einer Berenil-BSG-Lösung mit 0,35 mg Wirksubstanz Berenil pro 100 ml BSG-Lösung bei 37°C ausgesetzt und auf 3 Gruppen mit je 20 Mäusen übertragen (pro Tier ca. 1 500 Parasiten und 0,035 mg Berenil pro kg KGW ≈ 1/100 therapeutische Dosis).

Von den 60 Mäusen zeigten 1 Tier aus Gruppe 1 und 3 Tiere aus Gruppe 3 am 2. Tag p.i. eine schwache Parasitämie (Woo-Test 1+), die nach 2 Tagen wieder absank. In der Zeit bis zur Belastungsinfektion am 66. Tag p.i. (Gruppe 1), 34. Tag p.i. (Gruppe 2) und 34. Tag p.i. (Gruppe 3) konnten bei keiner Maus klinische Krankheitssymptome oder Parasiten im Blut festgestellt werden.

Zur Prüfung der Immunität wurden die Mäuse aus Gruppe 1 und 2 am 66. bzw. 34. Tag p.i. mit ca. 500 Parasiten pro Maus, aus Gruppe 3 am 34. Tag p.i. mit ca. 5 000 Parasiten pro Maus belastet. Dabei ergaben sich folgende Resultate:

Bei den Tieren aus Gruppe 1 und 2 konnten bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes bei 38 von 40 Mäusen weder klinische Symptome noch mikroskopisch eine Parasitämie festgestellt werden. Zwei Mäuse aus Gruppe 2 verendeten 6 bzw. 11 Tage nach der Belastungsinfektion nach rasch ansteigender Parasitämie. 16 von 20 Mäusen aus Gruppe 3 überlebten die 10fach höhere Belastungsdosis symptomfrei und ohne mikroskopisch nachweisbare Parasitämie. Drei Tiere zeigten nach 8 Tagen Parasiten im Blut und verendeten 3 Tage später, 1 Tier verendete interkurrent am 22. Tag nach der Belastung.

In der Kontrollgruppe zur Basisinfektion überlebten die Mäuse 6-10 Tage; die Kontrolltiere für die Belastungsinfektion verendeten nach 8-10 Tagen (Tab. 2; Nr. 5, 6, 7).

Parasiten, die 150 Minuten einer Berenil-Konzentration von 0,35 mg pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt waren, wurden auf 2 Gruppen mit je 20 Tieren übertragen. Als Basisinfektion erhielt demnach jede Maus ein Inokulum aus einem Gemisch von ca. 1 500 Parasiten und einer Berenildosis von 0,035 mg pro kg KGW i.p..

Vor der Belastungsinfektion mit ca. 500 Parasiten pro Tier nach 66 bzw. 34 Tagen p.i. wurde bei 3 Tieren aus Gruppe 1 am 15. Tag p.i.

eine Parasitämie beobachtet, zwei von diesen Mäusen verendeten 3 bzw. 16 Tage später. In der Gruppe 2 zeigte lediglich eine Maus am 3. Tag p.i. einen schwachen Parasitenbefall (Woo-Test 1+).
Nach der Belastungsinfektion verendeten 4 Tiere aus Gruppe 1 zwischen dem 7. und 13. Tag nach rasch ansteigender Parasitämie, in Gruppe 2 verendeten 4 Tiere zwischen 8. und 18. Tag. Die übrigen 30 Versuchstiere dieser beiden Gruppen überlebten symptomfrei und ohne mikroskopisch nachweisbare Parasitämie.
Die Kontrollmäuse für die Belastungsinfektion verendeten nach 8-10, für die Basisinfektion nach 6-10 Tagen p.i. (Tab. 2; Nr. 8, 9).

Tab. 2: Immunisierung mit ca. 1500 abgeschwächten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali aus Vollblut (verschiedene Berenilkonzentrationen, unterschiedliche Einwirkungszeiten)

Versuch Nr.	Zeit der Berenil-einwirkg. (Min.)	Berenil-Konz. (mg Wirksubst. pro 100 ml BSG)	Zahl der Versuchs-tiere	Tag der Belastungs-infektion p.i.	Tryp.-Zahl (Stamm Bali) pro Maus bei Belastung	Verhältnis überlebd.Tiere/ Tiere gesamt	Verhältnis überlebd.Tiere/ belastete Tiere	Durchschnittl. Überlebenszeit n.Belastg. (Tage)	Überlebenszeit d.Kontrolltiere zur Basisinfekt. (Tage p.i.)	Überlebenszeit d.Kontrolltiere zur Belastung (Tage p.i.)
1	5	14	20	42	500	18/20	18/18	—	6-7	9-10
2	5	3,5	10	42	500	7/10	7/7	—	6-7	9-10
3	30	3,5	20	34	500	16/20	16/17	7	6-8	8-10
4	90	0,35	20	42	500	13/20	13/17	14	6-10	9-10
5	120	0,35	20	66	500	20/20	20/20	—	6-10	8-10
6	120	0,35	20	34	500	18/20	18/20	9	6-10	8-10
7	120	0,35	20	34	5 000	16/20	16/20	14	6-10	8-10
8	150	0,35	20	66	500	14/20	14/18	10	6-10	8-10
9	150	0,35	20	34	500	16/20	16/20	10	6-10	8-10

Anmerkung: + 1 Maus interkurrent verendet

Zur Prüfung, ob es sich bei den durch Berenil-Einwirkung abgeschwächten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali um Varianten oder Modifikationen handelt, wurden eine Reihe von Passageversuchen durchgeführt.
Bei zahlreichen Mäusen, die mit Trypanosomen infiziert wurden, welche verschiedenen Berenil-Konzentrationen mit verschiedenen Einwirkungszeiten ausgesetzt gewesen waren, zeigte sich keine oder nur eine geringgradige Parasitämie. Von sehr schwach befallenen Mäusen mußte eine große Menge Blut bis zu 0,3 ml pro Maus übertragen werden, um im Passageversuch Parasiten nachweisen zu können. Dagegen wurden von Ausgangsmäusen mit höherer Parasitämie Inokula von 0,005 ml Blut i.p. verabreicht.(mit BSG-Puffer verdünnt).

Folgende Passageversuche wurden durchgeführt (je 2 Mäuse):

a) Mit Blut von Mäusen, die mit Parasiten infiziert waren, die 5 Minuten einer Berenil-Konzentration von 15 mg pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt waren, erzielte ich folgendes Ergebnis:
Die Überlebenszeit der 1. Passage betrug 16 Tage bzw. 26 Tage, die der 2. Passage 11 Tage bzw. 33 Tage, der 3. Passage 10 bzw. 26 Tage.

b) Parasiten, die 5 bzw. 30 Minuten einer Berenil-Konzentration von 3,5 mg pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt waren, zeigten bei der Passage folgendes Ergebnis:
Die 1. Passage verlief nach 15 und 7 Tagen bzw. 6 und 39 Tagen tödlich. Die Tiere der 2. Passage überlebten durchschnittlich 16 bzw. 10 (min. 4, max. 17) Tage. Von der Gruppe 2 (Einwirkungszeit 30 Minuten) wurde eine 3. Passage durchgeführt, die zum Tode nach 12 Tagen führte.

c) Mit Parasiten, die 60, 120 und 150 Minuten einer Berenil-Konzentration von 0,35 mg pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt waren, verlief die 1. Passage nach 10 und 22 Tagen bzw. nach 4 und 28 Tagen sowie nach 10 Tagen tödlich. Die 2. Passage bei Gruppe 2 (Einwirkungszeit 120 Minuten) und Gruppe 3 (Einwirkungszeit 150 Minuten) führte nach 8 und 25 Tagen bzw. nach 14 Tagen zum Tode. Von Gruppe 2 wurde noch ein 3. Passageversuch durchgeführt; dabei verendeten die Mäuse nach 9 und 10 Tagen p.i..

3.2.3.2. Immunisierung mit isolierten Parasiten

Die Versuche wurden durchgeführt mit Trypanosomen vom Stamm Bali, die nach der Methode von LANHAM (1968) von Blutbestandteilen getrennt wurden. Nach einer Einwirkungszeit von 30 Minuten in Berenil-BSG-Lösung mit einer Konzentration von 3,5 mg pro 100 ml BSG-Lösung wurden die Parasiten auf Mäuse übertragen. Es wurden 20 Mäuse mit dem Gemisch aus ca. 750 000 Parasiten und 0,35 mg pro kg KGW Berenil (≈1/10 therapeutische Dosis) pro Maus p.i. infiziert.
Bei 13 Mäusen wurde in der Zeit bis zur Belastungsinfektion am 35. Tag p.i. mikroskopisch kein Parasitenbefall beobachtet. 7 von 20 Versuchstieren zeigten in dieser Zeit eine ansteigende Parasitämie, die zum Tode führte (zwischen 13. und 28. Tag p.i.). Die überlebenden Mäuse wurden am 35. Tag p.i. mit ca. 500 Parasiten von T. evansi, Stamm Bali belastet und überlebten bis zum Ende der Beobachtungszeit 90 Tage nach der Belastung symptomfrei und ohne mikroskopisch nachweisbare Parasitämie.
Im Kontrollversuch zur Basisinfektion verendeten die 10 Mäuse nach 5 Tagen. Die 5 Kontrolltiere zur Belastungsinfektion verendeten nach 6 Tagen. (Tab. 3; Nr. 1).
Parasiten wurden 120 Minuten einer Berenil-Konzentration von 0,35 mg pro 100 ml BSG-Lösung ausgesetzt und danach auf 20 Mäuse übertragen. Dabei erhielt jedes Tier im Inokulum ein Gemisch aus ca. 750 000 Parasiten und eine Berenil-Dosis von 0,035 mg pro kg KGW (≈ 1/100 therapeutische Dosis). Zwei von 20 Mäusen verendeten bei ansteigender Parasitämie 9 bzw. 19 Tage p.i.. 18 von 20 Tieren zeigten bis zur Belastungsinfektion keinen mikroskopisch nachweisbaren Parasitenbefall.
Am 35. Tag p.i. wurden die Mäuse mit ca. 500 Parasiten vom Stamm Bali belastet. 5 Tage später zeigten 3 Mäuse Trypanosomen im Blut und verendeten am 8. Tag nach der Belastungsinfektion. 15 von 20 Mäusen überlebten die Beobachtungszeit (90 Tage) ohne klinische Erkrankung und ohne mikroskopisch nachweisbare Parasitämie.
Die 10 Kontrollmäuse zur Basisinfektion verendeten nach 6-13 Tagen, die 5 Kontrollen zur Belastungsinfektion nach 6 Tagen (Tab. 3; Nr. 2).

Tab. 3: Immunisierung mit ca. 750 000 isolierten, abgetöteten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali (verschiedene Berenil-Konzentrationen, unterschiedliche Einwirkungszeiten)

Versuch Nr.	Zeit d. Berenil-einwirkung (Min.)	Berenil-Konzentration (mg Wirksubst. pro 100 ml BSG)	Zahl d. Versuchstiere	Tag d. Belastung p.i.	Tryp.-Zahl (Stamm Bali) pro Maus bei Belastung	Verhältnis überlebender Tiere/ Tiere gesamt	Verhältnis überlebender Tiere/ belastete Tiere	Durchschnittl. Überlebenszeit n.Belastg. (Tage)	Überlebenszeit d. Kontrolltiere zur Basisinfekt. (Tage p.i.)	Überlebenszeit d.Kontrolltiere zur Belastung (Tage p.i.)
1	30	3,5	20	35	500	13/20	13/13	—	5	6
2	120	0,35	20	35	500	15/20	15/18	8	6-13	6

3.2.4. Immunisierung mit abgetöteten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali

Parasiten wurden entweder durch längeres Aufbewahren von Vollblut in EDTA-Röhrchen oder nach Isolierung mit der Methode von LANHAM (1968) in ß-Propiolacton abgetötet und auf Mäuse übertragen. Nachdem bei den Versuchstieren mikroskopisch keine Parasitämie feststellbar war, wurde die immunisierende Wirkung der Trypanosomen durch eine Belastungsinfektion mit ca. 500 virulenten Parasiten vom Stamm Bali geprüft.

3.2.4.1. Abtötung in EDTA-Röhrchen

Hochparasitiertes Vollblut (Nativpräp. 4+) wurde 12 Stunden lang in EDTA-Röhrchen bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Danach zeigten die Parasiten im Nativpräparat keine Beweglichkeit mehr.
16 Mäusen wurden je ca. 1 500 Parasiten verabreicht. Bis zur Belastungsinfektion am 40. Tag p.i. traten weder klinische Symptome noch eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie auf. In einem Zeitraum zwischen 5. und 20. Tag nach der Belastung verendeten 12 Mäuse: 3 Tiere nach 5, 2 Tiere nach 7, 2 Tiere nach 8, 1 Tier nach 12, 3 Tiere nach 16 und 1 Tier nach 20 Tagen. Vier Mäuse überlebten im Beobachtungszeitraum bis zum 90. Tag nach der Belastung ohne mikroskopisch nachweisbare Parasitämie oder klinische Symptome.
Im Kontrollversuch wurde hochparasitiertes Blut in Röhrchen, die unbeschichtet waren und Vetren als Antikoagulans enthielten, 12 Stunden lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann übertragen (Inokulum ca. 1 500 Parasiten pro Maus). Die Tiere verendeten alle bis zum 6. Tag p.i Die Kontrolltiere zur Belastungsinfektion überlebten 6-13 Tage.

3.2.4.2. Abtötung mit ß-Propiolacton

T. evansi, Stamm Bali wurden nach der Methode von LANHAM (1968) von Blutbestandteilen getrennt und 90 Minuten lang bei -4°C einer 0,1%igen Konzentration von ß-Propiolacton in BSG-Puffer ausgesetzt. Nach dieser Zeit zeigten die Parasiten keine Bewegungsaktivität mehr.
Nach der Übertragung von ca. 750 000 Trypanosomen pro Maus konnte bei den 25 Versuchstieren bis zur Belastungsinfektion am 35. Tag p.i.

weder eine klinische Erkrankung noch eine mikroskopisch nachweisbare Parasitämie beobachtet werden. Eine von 25 Mäusen verendete interkurrent am 23. Tag p.i. bei der Blutentnahme. Nach der Belastungsinfektion am 35. Tag p.i. mit 500 T. evansi, Stamm Bali blieben alle 24 Tiere im Beobachtungszeitraum von 90 Tagen danach symptomfrei. Auch mikroskopisch war kein Parasitenbefall im Blut festzustellen.
Im Kontrollversuch wurden 10 Mäuse mit 750 000 Parasiten pro Maus infiziert. Die Trypanosomen waren in BSG-Puffer ohne ß-Propiolacton 90 Minuten lang bei -4°C aufbewahrt worden. Die Mäuse verendeten nach 6-13 Tagen. 5 Kontrollmäuse zur Belastungsinfektion verendeten nach 6 Tagen.

3.2.5. Antikörpertiter-Verlauf bei immunisierten Mäusen vor und nach der Belastungsinfektion

Die serologische Untersuchung der Mäuse aus der ersten Gruppe (Berenil-Konzentration 1/10 therapeutische Dosis = 3,5 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung, Einwirkungszeit 30 Minuten) hat gezeigt, daß die Bildung der Antikörper schon mit dem 5. Tag p.i. einsetzt. Das wurde deutlich durch den Titeranstieg auf 1:128. Maximaltiter von 1:512 wurden am 21. und am 31. Tag p.i. erreicht. Im weiteren Verlauf der 50 Tage dauernden Beobachtungszeit lagen die Antikörpertiter zwischen 1:128 und 1:512 (Abb. 1).

Bei den Mäusen der Gruppe 2 (Berenil-Konzentration 1/100 therapeutische Dosis = 0,35 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung, Einwirkungszeit 120 Minuten) zeigte sich ebenfalls schon am 5. Tag p.i. ein Titeranstieg auf 1:64, der Höchstwert von 1:1024 war am 26. Tag p.i. erreicht. Die bis auf geringe Schwankungen konstante Titerhöhe lag bei 1:256 (Abb. 1).

In der dritten Gruppe (Parasiten mit ß-Propiolacton abgetötet) lag der erreichte Maximaltiter bei 1:128 (am 13. Tag p.i.), während des weiteren Beobachtungszeitraumes schwankten die Werte zwischen 1:64 und 1:128 (Abb. 1).

Die Belastungsinfektion am 35. Tag p.i. mit ca. 500 virulenten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali zeigte hinsichtlich der Antikörpertiter bei keiner Gruppe von Versuchstieren Auswirkungen.

Die photometrische Auswertung der Farbreaktionen in den Plattenkavitäten vor und nach dem Abstoppen der Enzymaktivität erbrachte gelegentlich Titerdifferenzen von maximal einer Stufe, was für die Beurteilung des Antikörper-Titers ohne Bedeutung ist.

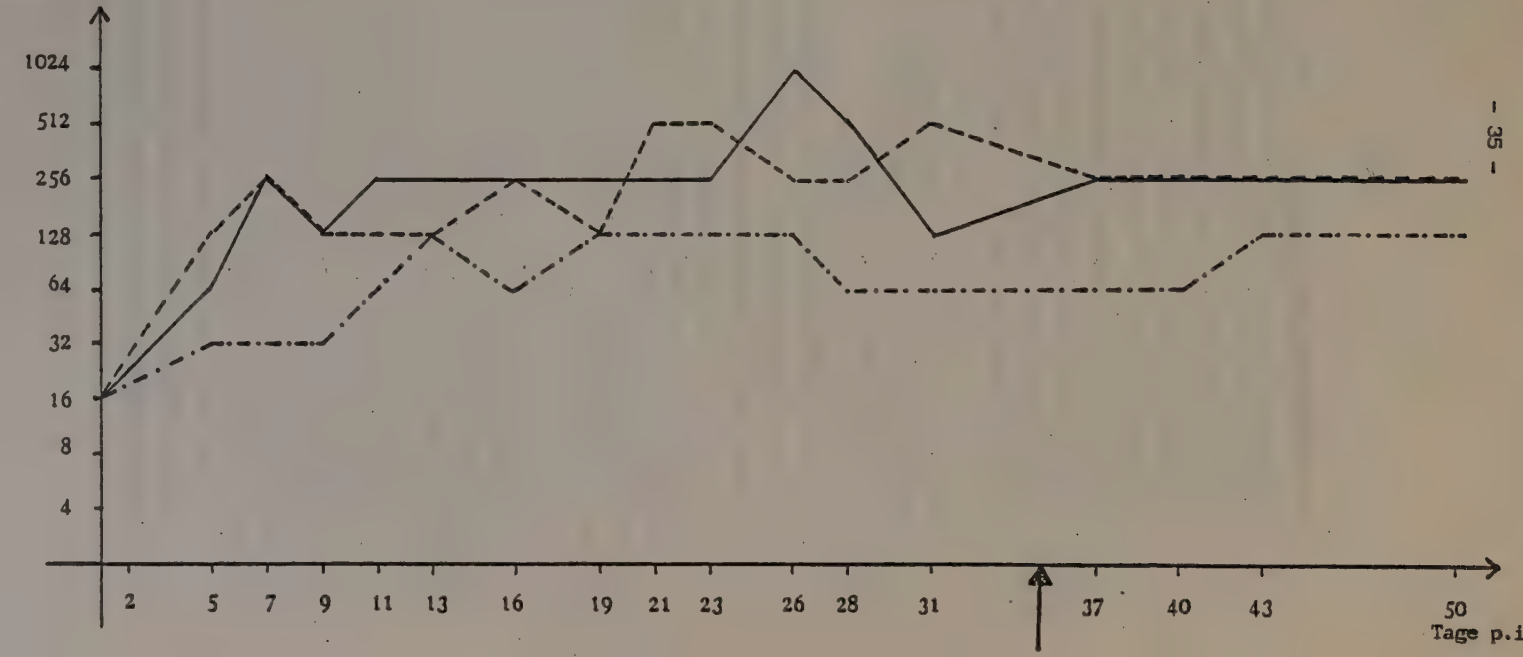
bb. 1: Antikörpertiter-Verlauf bei Mäusen, die mit abgeschwächten (Gruppe 1 und 2) bzw. abgetöteten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali infiziert umd mit virulenten Parasiten desselben Stammes belastet wurden (500 Parasiten pro Maus am 35. Tag p.i.)

---- Gruppe 1 (Berenil-Konzentration: 3,5 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung, Einwirkungszeit 30 Min.)

—— Gruppe 2 (Berenil-Konzentration: 0,35 mg Wirksubstanz pro 100 ml BSG-Lösung, Einwirkungszeit 120 Min.)

-.-.- Gruppe 3 (mit β-Propiolacton abgetötete Parasiten)

iter 1:



4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Meine Arbeit hatte das Ziel festzustellen, ob eine Immunisierung gegen die T. evansi-Infektion der Maus mit virulenzgeschwächten Trypanosomen möglich ist. Für die Untersuchungen stand eine wenig virulente Variante von T. evansi, Stamm Bali zur Verfügung, die sich in Verbindung mit den chemotherapeutischen Versuchen von HARRANT (1978) entwickelt hatte. Außerdem bot sich die von MELZER (1980) angewandte Methode an, auf experimentellem Wege ähnliche Varianten zu erzeugen. Die erwähnte Variante hatte sich bei der Behandlung einer stark parasitierten Maus mit Berenil in hoher Dosierung gebildet. Nach ihrer Isolierung zeigte sich, daß sie wesentlich weniger virulent als der Ausgangsstamm Bali war und daß sich auch im Laufe der Passagierung die ursprüngliche Virulenz nicht mehr einstellte.

Diese Variante Bali führte in meinen Versuchen zu einer sicheren Immunisierung der Mäuse und bot einen ausreichenden Schutz gegen Infektionen mit dem stark virulenten Ausgangsstamm. Von 20 Mäusen überlebten 15 die Belastungsinfektion ohne Anzeichen einer klinischen Erkrankung und ohne die Ausbildung einer Parasitämie. Nur bei 3 Mäusen kam es zum Ausbruch der Krankheit mit schneller Todesfolge. Offensichtlich waren diese Tiere nicht fähig, eine genügend hohe Immunität aufzubauen. Obwohl die Immunisierung mit den abgeschwächten Parasiten guten Erfolg hat, ist ihre Anwendung dennoch problematisch. Da es sich nicht um eine "avirulente" Variante handelt, spielt bei der Überwindung der Infektion zweifellos die "individuelle Resistenz" der Maus (MELZER, 1980) eine entscheidende Rolle. Damit ist nicht auszuschließen, daß es schon bei der Basisinfektion mit der Variante zu Durchbrüchen kommt, die unter Umständen tödlich verlaufen, Beobachtungen, die sowohl von MELZER (1980) als auch von mir regelmäßig gemacht wurden. Dies muß als wesentlicher Nachteil bei der Immunisierung mit T. evansi, Variante Bali angesehen werden.

Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, daß es nicht möglich ist, bei der 'in vivo'-Einwirkung von Berenil "gezielt" Varianten zu erzeugen (MELZER, 1980), so daß die Gewinnung solcher abgeschwächter T. evansi-Varianten immer langwierig und aufwendig sein wird.

Ich führte deshalb im Rahmen meiner Untersuchungen auch Versuche in vitro durch, um mit Hilfe direkter Einwirkung des Trypanozids auf den Parasiten abgeschwächte T. evansi zu erzeugen. Auf diese Weise wurde die Maus mit ihrer unberechenbaren individuellen Resistenz und ihrer unterschiedlichen Immunitätsbereitschaft bei der Abschwächung der Parasiten ausgeschaltet. Es zeigte sich, daß bei einer günstigen Wahl von Einwirkungszeit und Konzentration der trypanoziden Substanz die Trypanosomen in ihrer Virulenz soweit abgeschwächt werden können, daß sie bei Mäusen zu keinen klinischen Krankheitserscheinungen mehr führen. Dabei bleiben offensichtlich die protektogenen Eigenschaften weitgehend erhalten.

Diese Versuchsergebnisse stimmen mit denen von JAMES (1976) und HUNGERER et al. (1976) überein. JAMES (1976) wies nach, daß T. brucei und T. congolense durch "Baden" in verschiedenen Konzentrationen von Berenil ihre Virulenz verlieren und mit gutem Erfolg zur Immunisierung verwandt werden können. HUNGERER et al. (1976) machten ähnliche Beobachtungen bei Versuchen mit der Einwirkung von Ethidiumbromid auf T. cruzi.

Bei der Prüfung der immunologischen Wirksamkeit der in vitro abgeschwächten Parasiten zeigten meine Untersuchungen sowohl bei der Verwendung von "behandeltem" hochparasitiertem Vollblut als auch von isolierten Parasiten, daß Berenil-Konzentrationen von 3,5 und 0,35 mg pro 100 ml Bicine buffered saline-glucose (BSG)-Lösung bei Einwirkungszeiten von 30 bzw. 120 Minuten die Parasiten in dem Maße beeinflussen, daß sie Mäuse gegen Belastungsinfektionen schützen. Es ist sicherlich berechtigt, in diesem Zusammenhang sogar von einer massiven Schutzwirkung zu sprechen, wenn man von der Tatsache ausgeht, daß in den Versuchen die Belastungsinfektion bis zu 5 000 Parasiten pro Maus betrug, wobei schon ein einzelner Parasit genügen würde, um eine tödlich verlaufende Infektion zu induzieren. Dieses Resultat wird meiner Meinung nach auch dadurch nicht begünstigt, daß mit dem Inokulum geringe Mengen von Berenil mit übertragen wurden. Es handelt sich hierbei um Berenildosen von 1/10 bzw. 1/100 der therapeutischen Dosis von 3,5 mg pro kg KGW, die ohne Zweifel für einen prophylaktischen Effekt nach

der Belastungsinfektion nicht ausreichen. HARRANT (1978) hatte in seinen Untersuchungen nachgewiesen, daß bei der therapeutischen Dosierung von Berenil schon nach 8 Tagen post appl. eine prophylaktische Wirksamkeit fehlt. Damit dürfte bei meinen Versuchen, in denen die Belastungsinfektion zwischen 34 und 66 Tagen nach der Verabreichung des berenilhaltigen Inokulums durchgeführt wurde, jede verzögernde Wirksamkeit des Berenils auszuschließen sein.

Bei den Immunisierungsversuchen mit isolierten Parasiten, auf die Berenil in gleichen Konzentrationen und Zeiten einwirkte, wurden ebenfalls sehr günstige Resultate erzielt. Hierbei überlebten 28 von 31 Mäusen symptomfrei die massive Belastungsinfektion. Allerdings war bei diesen Untersuchungen der Ausfall nach der Basisinfektion mit 9 von 40 Mäusen relativ hoch. Offensichtlich besteht eine unterschiedliche Einwirkungsintensität des Trypanozids, die abhängig davon ist, in welchem Medium sich die Parasiten, im vorliegenden Fall Vollblut und BSG oder nur BSG, befinden.

Es stellte sich in Verbindung mit diesen Untersuchungen die Frage, ob es sich bei den Parasiten, die durch trypanozide Einwirkung in ihrer Virulenz verändert wurden, um Varianten handelt, d.h., daß die veränderten biologischen Eigenschaften des Erregers über eine bestimmte Folge von Generationen im Phänotyp erhalten bleiben (MELZER, 1980) oder ob hier Modifikationen vorliegen.

Nach dem Reallexikon der Medizin und ihrer Grenzgebiete (Band 5,1973) versteht man darunter die von einem bestimmten Genotyp unter verschiedenen inneren oder äußeren Entwicklungsbedingungen erzeugten Phänotypen. Sie sind sexuell nicht vererbbar, werden manchmal jedoch mitotisch auch unter anderen Bedingungen eine Zeitlang konstant weitergegeben ("Dauer-Modifikationen").

Zur Klärung dieser Frage wurden in einzelnen Versuchen mit den fraglichen Trypanosomen bis zu drei Passagen durchgeführt. Dabei zeigten sich trotz teilweise verlängerter Überlebenszeiten der Versuchstiere keine Hinweise auf übertragbare Abschwächung der Virulenz, die der der "behandelten" Ausgangsparasiten gleichkommt. In meinen Versuchen handelt es sich deshalb um Modifikationen von T. evansi, Stamm Bali,

die sich durch eine abgeschwächte Virulenz auszeichnen. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß in dem behandelten Trypanosomen-Pool nicht auch echte Varianten auftreten können. MELZER (1980) zeigte, daß aus einem behandelten Wirtstier sowohl Modifikationen als auch echte Varianten isoliert werden können.

Neben den Versuchen mit lebenden, virulenzgeschwächten Parasiten wurden auch Untersuchungen mit abgetöteten T. evansi durchgeführt. Dabei wurde bewußt auf die Abtötung der Parasiten durch Methoden, wie Hitzekoagulation, hypotonische Zerstörung der Zellen durch Aqua dest., Einfrieren und Wiederauftauen u.ä. verzichtet, da bei diesen Techniken die Trypanosomen in einzelne Fragmente zerlegt werden. Ich wählte eine bereits von LOGRIPPO und HARTMAN (1955) bei der Virusinaktivierung und von SOLTYS (1967) sowie NEAL und JOHNSON (1977) verwendete Möglichkeit, mit Hilfe von B-Propiolacton besonders schonend für die immunogenen Eigenschaften die Parasiten abzutöten.

Außerdem bot sich als weitere Methode zur Abtötung eine längere Aufbewahrung der Trypanosomen in Röhrchen, die mit EDTA di-Kalium als Antikoagulans für Blut beschichtet waren, an. Wie wir festgestellt hatten, blieb bei den Parasiten Infektiosität und Virulenz nach kurzer Aufbewahrungszeit in diesen Röhrchen erhalten, aber nach 12 Stunden waren die Trypanosomen offensichtlich abgetötet. Mäuse, die ein Inokulum aus diesen Parasiten erhielten, zeigten bis zur Belastungsinfektion mikroskopisch keine Parasitämie. Allerdings waren die auf diese Weise abgetöteten Trypanosomen in ihren immunisierenden Eigenschaften beeinträchtigt. Lediglich 4 von 16 Mäusen waren geschützt, 12 von 16 Tieren erkrankten klinisch nach der Belastungsinfektion und verendeten nach ansteigender Parasitämie. Im Gegensatz hierzu bewirkten die mit B-Propiolacton abgetöteten Parasiten bei allen Versuchstieren einen völligen Schutz gegen die Belastungsinfektion, die protektogenen Eigenschaften von T. evansi blieben bei dieser Methode voll erhalten. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von SOLTYS (1967) und NEAL und JOHNSON (1977) bei anderen Trypanosomen.

Eine Reihe von Versuchen mit der schwach virulenten Variante Bali und T. evansi anderer Herkunft wurden durchgeführt, um festzustellen, ob eine immunologische Verwandtschaft besteht. Geprüft wurde die Variante Bali gegen den Ausgangsstamm Bali. Es zeigte sich dabei eine gute Schutzwirkung. 15 von 20 Mäusen überlebten ohne Krankheitssymptome die Belastungsinfektion mit einer Parasitendosis, die die Kontrolltiere schon nach 6-7 Tagen tötete. 3 von 5 Mäusen erkrankten an der Trypanosomiasis mit rasch ansteigender Parasitämie. Die Infektion führte nach wenigen Tagen zum Tod. Diese Tiere hatten vermutlich eine ungenügende Immunität nach der Basisinfektion ausgebildet.

Die Variante Bali wurde weiterhin mit dem passagierten Stamm Kairo geprüft. Nach häufigen Passagen war aus dem wenig virulenten Stamm Kairo die hochvirulente "Kairo-Passage" entstanden, mit einer Mortalitätsrate von 100% für Mäuse. Nach der Belastung der Variante Bali mit dieser hochvirulenten "Kairo-Passage" erkrankten 35 von 40 Mäusen und verendeten nach der gleichen Zeit wie die Kontrolltiere. 5 Mäuse überlebten ohne klinische Symptome eine Belastungsinfektion mit 50 Parasiten pro Maus, während 15 Mäuse an derselben Dosis verendeten, ebenso wie 20 mit je 500 Parasiten belastete Tiere. Der Kontrollversuch zeigte, daß eine natürliche Resistenz als Ursache für das Überleben der 5 Tiere nicht anzunehmen ist. Daher ist es wahrscheinlich, daß diese Tiere nicht infiziert worden waren.

Im Zusammenhang mit der Prüfung der Kreuzimmunität stellte sich die Frage, ob sich die Ausgangsstämme (T. evansi, Stamm Bali und T. evansi Stamm Kairo) zueinander immunologisch ähnlich verhalten wie die Variante Bali zu den virulenten Stämmen.

Die Parasiten vom Stamm Kairo führen bei Mäusen nur zu einer latenten Infektion. Erst nach 30-40 Passagen werden die Erreger, wie bereits oben erwähnt, so virulent, daß sie 100% der Tiere innerhalb von 15 Tagen, bei höheren Passagen nach 6-8 Tagen, töten.

Nach der Basisinfektion mit dem schwach virulenten Ausgangsstamm Kairo wurden die Versuchstiere mit T. evansi, Stamm Bali belastet und verendeten, mit einer Ausnahme. Zwar zeigten die Mäuse nach einer geringgradigen Belastungsinfektion etwas längere Überlebenszeiten als Tiere,

die mit der 10fachen Anzahl von Parasiten belastet wurden, aber verglichen mit den Kontrolltieren verlief die Infektion ohne Verzögerung. Die überlebende Maus war anscheinend nicht infiziert worden.

15 von 20 Mäusen überlebten nach einer Basisinfektion mit T. evansi, Stamm Kairo die Belastungsinfektion mit der hochvirulenten "Kairo-Passage". 5 von 20 Versuchstieren verendeten nach durchschnittlich 21 Tagen. Ihre Immunität war meiner Ansicht nach nicht genügend belastungsfähig, obwohl die Überlebenszeiten deutlich verlängert waren (durchschnittlich 15 Tage Überlebenszeit der Kontrolltiere).

Das Resultat der Untersuchungen zur Kreuzimmunität ist bei Versuchen mit experimentell abgeschwächten Parasiten wie bei den Ausgangsstämmen gleich: eine Immunität innerhalb homologer Antigen-Typen ist möglich, nicht aber eine Immunisierung gegen heterologe Antigen-Typen. Ähnliche Beobachtungen machten auch EHRLICH (1907) mit T. brucei und TERRY (1911) mit T. evansi. TERRY (1976), MURRAY und URQUHART (1977) und HOLMES (1980) machten ebenfalls darauf aufmerksam, daß es bisher bei afrikanischen Trypanosomen nicht gelungen ist, eine immunisierende Wirkung gegen heterologe Antigen-Typen nachzuweisen.

Mit Hilfe des Enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA) gelang es mir, Antikörper gegen eine experimentelle Infektion mit abgeschwächten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali bei Mäusen nachzuweisen. Auch bei der Verwendung von abgetöteten Parasiten als Immunogen bildeten die Versuchstiere Antikörper. Bereits VAN KNAPPEN, BUYS und RUITENBERG (1977), VOLLER (1977), LUCKINS (1977) und LUCKINS und MEHLITZ (1978) untersuchten mit dem ELISA die Antikörperbildung bei Infektionen mit afrikanischen Trypanosomen. Obwohl es sich hier um andere Trypanosomen-Arten handelte, beschrieben sie ähnlich den von mir erzielten Resultaten einen allmählich ansteigenden Antikörpertiter, der dann über einen längeren Zeitraum auf einem Plateau verläuft. LUCKINS, GRAY und RAE (1978) wiesen mit dem ELISA bei experimentell mit T. evansi infizierten Kaninchen vor und nach der Behandlung mit Suramin® Antikörper gegen die Trypanosomen mit einer Verlaufskurve der Titer ähnlich wie bei meinen Untersuchungen nach. Bei meinen Versuchen mit Mäusen zeigten alle Versuchstiergruppen einen allmählichen Titeranstieg mit einem Maximalwert bei 1:1024 und einem durchschnittlichen Niveau

zwischen 1:64 und 1:512. Die Versuchstiergruppen, die mit lebenden, virulenzgeschwächten Parasiten infiziert waren, hatten durchschnittlich einen um 1-2 Titerstufen höheren Antikörpertiter als die Mäuse, die abgetötete Parasiten als Antigen erhalten hatten. Die Antikörperantwort ist also bei der Verwendung lebender Parasiten als Antigen stärker als bei Totantigen. Die Belastungsinfektion mit ca. 500 virulenten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali am 35. Tag p.i. zeigte bei allen Versuchstiergruppen keinen erkennbaren Einfluß auf die Antikörperbildung.

Meine Untersuchungen zeigten, daß es möglich ist, erfolgreich gegen die T. evansi-Infektion bei der Maus zu immunisieren. Dabei empfehlen sich sowohl abgeschwächte Varianten und Modifikationen als auch abgetötete Parasiten. Die Immunisierung mit Trypanosomen, die mit Hilfe von ß-Propiolacton abgetötet wurden, zeigte bei meinen Untersuchungen die besten Erfolge, obwohl gerade in dieser Gruppe die humorale Immunantwort, gemessen am Antikörpertiter des Serums, weniger stark ausgeprägt erschien als bei den Tieren, die mit virulenzgeschwächten, aber lebenden Parasiten immunisiert worden waren. Diese abgetöteten Parasiten werden sich vermutlich am besten zur Herstellung einer Vakzine eignen. Aber auch abgeschwächte, jedoch keineswegs avirulente Trypanosomen induzieren eine gute Schutzwirkung. Eine Totvakzine hat allerdings den Vorteil, daß die Verbreitung lebender Impfstämme auf diese Weise vermieden wird.

Die am Modell Maus erzielten Ergebnisse zeigen eventuell Wege auf zur Immunisierung von Nutztieren, um die durch die Surra verursachten großen wirtschaftlichen Schäden besonders in den Ländern der dritten Welt zu verringern.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Anhand der Literatur wurde ein Überblick über die Immunisierung gegen die Trypanosomiasis unter besonderer Berücksichtigung der T. evansi-Infektion gegeben.

Der experimentelle Teil der Arbeit befaßte sich mit der Immunisierung gegen die Trypanosoma evansi-Infektion bei der Maus mit abgeschwächten und mit abgetöteten Parasiten.

Trypanosomen der schwach virulenten Variante Bali schützten die Versuchstiere gegen eine Belastung mit dem virulenten Stamm Bali. Ebenso war es möglich, gegen die "Kairo-Passage" mit ihrer gesteigerten Virulenz mit dem schwach virulenten Kairo-Ausgangsstamm zu immunisieren.

Eine gute Immunität gegen die Infektion mit T. evansi, Stamm Bali erzeugten Trypanosomen des Stammes Bali, die in vitro entweder in Vollblut oder von Blutbestandteilen isoliert der Einwirkung von Berenil ausgesetzt und dadurch in ihrer Virulenz abgeschwächt wurden.

Trypanosomen vom Stamm Bali, die mit Hilfe von β-Propiolacton abgetötet wurden, boten einen vollkommenen Schutz gegen die Infektion mit virulenten Parasiten von T. evansi, Stamm Bali. Durch Aufbewahrung in EDTA-Röhrchen abgetötete Parasiten eigneten sich nicht zur Immunisierung gegen virulente Parasiten.

Eine Immunisierung gegen heterologe Antigen-Typen erwies sich als nicht möglich mit den von mir verwendeten schwach virulenten Parasiten von T. evansi, Stamm Kairo und der Variante Bali.

Mit Hilfe des Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) gelang der Nachweis von Trypanosoma-Antikörpern bei allen immunisierten Mäusen. Die Antikörpertiter waren bei Tieren, die mit virulenzgeschwächten, lebenden Parasiten immunisiert worden waren, höher. Eine Belastungsinfektion mit virulenten Erregern blieb serologisch ohne erkennbaren Einfluß auf den Antikörpertiterverlauf.

HERTKORN, U.: Investigations on the immunization to Trypanosoma evansi infection in the mouse

Summary

The literature is reviewed about the immunization against trypanosoma-infections with special reference to Trypanosoma evansi.

Experimentally, mice were immunized against T. evansi-infections with attenuated or dead parasites.
Mice, immunized with attenuated parasites of the Bali variant, were protected against challenge infections with the virulent T. evansi Bali strain.
Likewise, it was possible to immunize mice against the T. evansi Kairo passage with its enhanced virulence, using the low virulent strain Kairo.
Trypanosomes of the Bali strain attenuated by in vitro exposure to Berenil in either blood or buffered saline, induced a considerable immunity to challenge infections with the homologous strain.
Trypanosomes killed by β-propiolactone induced an entire protection against challenge infections with the homologous virulent Bali strain.

The immunization with the low virulent trypanosomes of the Kairo strain and the attenuated trypanosomes of the Bali strain was ineffective against challenge infections with heterologous antigenic types.
By means of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) antibodies to T. evansi could be demonstrated in all immunized mice. Antibody-titres were higher in sera of those animals, which were immunized with living attenuated parasites. Challenge infections showed serologically no effect on the antibody-formation.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Bevan, U.E.W. (1928): A method of inoculating cattle against trypanosomiasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 22, 147-156

Bevan, U.E.W. (1936): Notes on immunity in trypanosomiasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 30, 199-206

Clarkson, M.J. (1976): Trypanosomes. Vet. Parasitol. 2, 9-29

Duxburry, R.E. and E.H. Sadun (1969): Resistance produced in mice and rats by inoculation with irradiated Trypanosoma rhodesiense. J. Parasitol. 55, 859-865

Duxburry, R.E., E.H. Sadun and J.S. Anderson (1972): Experimental infections with African trypanosomes. II. Immunization of mice and monkeys with a gamma-irradiated, recently isolated human strain of Trypanosoma rhodesiense. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21, 885-888

Duxburry, R.E., E.H. Sadun, M.J. Schoenbechler and D.A. Stroupe (1974): Trypanosoma rhodesiense: protection in mice by inoculations of homologous parasite products. Exp. Parasitol. 36, 70-76

Ehrlich, P. and K. Shiga (1904): Farbentherapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankung. Berl. Klin. Wschr. xli, 329, 369

Ehrlich, P. (1907): Chemotherapeutische Trypanosomen-Studien. Berl. Klin. Wschr., xliv, 233, 280, 310, 341

Engvall, E., P. Perlmann (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol. 109, 129-135

Gonzalez-Cappa, S.M., G.A. Schmuñis, O.C. Traversa, J.F. Yanovsky and A.S. Parodi (1968): Complement-fixation tests, shin tests, and experimental immunization with antigens of Trypanosoma cruzi prepared under pressure. Am. J. Trop. Med. Hyg. 17, 709-715

Gonzalez-Cappa, S.M., U.J. Pesce, A.I. Cantarelle and G.A. Schmuñis (1974): Trypanosoma cruzi: protection of mice with epimastigote antigens from immunologically different strains. Exp. Parasitol. 35, 179-186

Halberstaedter, L. (1905): Untersuchungen bei experimentellen Trypanosomenerkrankungen. Cent. f. Bakt., Orig., xxxvii, 525

Harrant, J. (1978): Untersuchungen zur Chemotherapie und Chemoprophylaxe der Trypanosoma evansi-Infektion (Stamm Bali) bei der Maus. Vet. med. Diss., München

Herbert, W.J. and W.H.R. Lumsden (1968): Single-dose vaccination of mice against experimental infection with Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. J. Med. Microbiol. 1, 23-32

Herbert, W.J. and R.F. Macadam (1971): The immunization of mice with Trypanosome plasmanemes (filopodia). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg 65, 240

Holmes, P.H. (1980): Vaccination against Trypanosomes. Vaccines against parasites. Brit. Soc. Parasitol. Symposia; 18, 75-105

Hungerer, K.D., B. Enders and O. Zwisler (1976): On the immunology of infection with T. cruzi. 2. The preparation of an apathogenic living vaccine. Behring Inst. Mitt. No. 60, 84-97

James, D.M., A.O. Fregene and K. Salomon (1973): The effect of irradiation on infectivity and immunogenicity of Trypanosoma brucei J. Parasitol. 59, 489-492

James, D.M. (1976): Induction of immunity in rodents receiving living drug-treated trypanosomes. Int. J. Parasitol. 6, 179-182

Lanham, S.M. (1968): Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. Nature 218, 1273-1274

Lanham, S.M., D.G. Godfrey (1970): Isolation of Salivarian Trypanosomes from Man and other Mammals using DEAE-Cellulose. Exp. Parasit. 28, 521-534

LoGrippo, G.A., F.W. Hartman (1955): Antigenicity of beta-propiolacton inactivated virus vaccines. J. Immunol. 75, 123-128

Luckins, A.G. (1977): Detection of antibodies in trypanosome infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. Trop. Anim. Hlth. Prod. 9, 53-62

Luckins, A.G., A.R. Gray and P. Rae (1978): Comparison of the diagnost value of serum immunoglobulin levels, an enzyme linked immunosorbent assay and a fluorescent antibody test in experimental infections with Trypanosoma evansi in rabbits. Ann. Trop. Med. Parasit. 72, 492-441

Luckins, A.G. and D. Mehlitz (1978): Evaluation of an indirect fluorescent antibody test, enzyme-linked immunosorbent assay and quantification of immunoglobulins in the diagnosis of bovine trypanosomiasis. Trop. Anim. Hlth. Prod. 10, 149-159

Mc'Hardy, N. (1977): Passive Immunization of mice against Trypanosoma cruzi using convalescent mouse serum. Tropenmed. Parasit. 28, 195-201

Mc'Hardy, N. (1978): Immunization of mice against Trypanosoma cruzi: the effect of chemical treatment or immune serum on an epimastigote vaccine. Tropenmed. Parasit 29, 215-222

Mühlpfordt, H. (1964): Die Generationsdauer verschiedener Trypanosomenarten. Ztschr. Tropenmed. Parasit. 15, 109-117

Melzer, I.(1980): Untersuchungen zum Einfluß von Berenil^{R} auf die Variantenbildung bei Trypanosoma evansi (Stamm Bali) in der Maus. Vet. med. Diss., München

Murray, M., G.M. Urquhart (1977): Immunoprophylaxis against African Trypanosomiasis. In: L.H. Miller and J.J. McKelvey, Jr. (eds.) Advances in Experimental Medicine and Biology, 93, 209-241,Plenum Press New York and London

Neal, R.A. and P. Johnson (1977): Immunization against Trypanosoma cruzi using killed antigens and with saponin as adjuvant. Acta Tropica, 34, 87-96

Nöller, H.G. (1955): Die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus. Klin. Wschr. 33, 770-775

Reallexikon der Medizin und ihrer Grenzgebiete, 5. Band (1973). Urban und Schwarzenberg, München-Berlin-Wien

Reif, L. (1980): Der serologische Nachweis der Babesia divergens-Infektion des Rindes mit der Immunfluoreszenz, der indirekten Hämagglutination und dem Immuno-Enzymtest. Vet. med. Diss., München

Ryu, E. (1975): Efficacy of killed vaccine of Trypanosoma evansi in mice. Abstr. 7th Internat. Conference on "Pathophysiology of Parasitic Infections" of the Wld. Ass. for the Adv. of Vet. Parasitol., July 14-16, Thessaloniki, Greece

Scott, M.T., P.H. Holmes, F.W. Jennings and G.M. Urquhart (1978): Attempted protection of Zebu cattle against trypanosomiasis using a multistabilate vaccine. Res. Vet. Sci 25, 115-117

Seed, J.R. (1963): The characterization of antigens isolated from Trypanosoma rhodesiense. J. Protozool. 10, 380-389

Seed, J.R. and A.A. Gam (1966): Passive immunity to experimental trypanosomiasis. J. Parasitol. 52, 1134-1140

Soltys, M.A. (1964): Immunity in trypanosomiasis. V. Immunization of animals with dead trypanosomes. Parasitology 54, 585-591

Soltys, M.A., I.M. Smith (1963): Studies of protective antibodies in trypanosomiasis in diseased and vaccinated animals. Proc. 17. Internat. Vet. Congr. (Hannover, 1963)

Soltys, M.A. (1967): Comparative studies of immunogenic properties of Trypanosoma brucei inactivated with beta-propiolactone and with some other inactivating agents. Can. J. Microbiol. 13, 743-747

Stubbs, R.K., G. Bobalik and N. Ercoli (1958): Effect of x-ray irradiation on T. equiperdum in vivo and in vitro. J. Infect. Dis. 102, 35-43

Taylor, A.E.R., S.M. Lanham and J.E. Williams (1974): Influence of methods of preparation on the infectivity, agglutination, activity and ultrastructure of bloodstream trypanosomes. Exp. Parasit. 35, 196-208

Terry, B.T. (1911): Chemo-therapeutic trypanosome studies with special reference to the immunity following cure. Monographs of the Rockefeller Institute for Medical Research. Number 3, March 15, 1911

Terry, R.J. (1976): Immunity to African Trypanosomiasis. In: Immunology of Parasitic Infections, S. Cohen and E. Sadun (eds.) pp. 203-221. Blackwell Scientific Publications Oxford

Van Knappen, F., J. Buys, E.I. Ruitenberg (1977): Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and its application to the serodiagnosis of African trypanosomiasis. Ann. Soc. belge Méd. trop. 57, 281-292

Voller, A. (1977): Serology of African trypanosomiasis. Ann. Soc. belge Méd. trop. 57, 272-280

Wellde, B.T., R.T. Duxburry, E.H. Sadun, H.R. Langbehn, R. Lotzsch, G. Deindl and G. Warni (1973): Experimental infections with African trypanosomes. IV. Immunization of cattle with gamma-irradiated Trypanosoma rhodesiense. Exp. Parasitol. 34, 62-68

Wellde, B.T., M.J. Schoenbechler, C.L. Diggs, H.R. Langbehn and E.H. Sadun (1975): Trypanosoma rhodesiense: variant specificity of immunity endured by irradiated parasites. Exp. Parasitol. 37, 125-129

Woo, P.T.K. (1969): The haematokrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. Can. J. Zool. 47, 921-923

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H.K. Dennig für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gern gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. J. Boch möchte ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit danken.

Ganz herzlich danken möchte ich außerdem Herrn Dr. G. Weiland, der mir beim serologischen Teil meiner Arbeit eine große Hilfe war.

Lebenslauf

1. Angaben zur Person:

Name:	Uta Maria Hertkorn
Geburtsdatum:	9. Oktober 1952
Geburtsort:	7990 Friedrichshafen
Eltern:	Karl Hertkorn, Rentner
	Anna Christina Hertkorn, geb. Immler

2. Schulbildung, Studium und Berufspraxis:

1959:	Eintritt in die Volksschule Schreienösch in Friedrichshafen
1963:	Übertritt ins Progymnasium für Mädchen in Friedrichshafen
1968:	Übertritt ins Graf-Zeppelin-Gymnasium in Friedrichshafen
1971:	Zeugnis der Reife
1971:	Beginn des Biologiestudiums in Tübingen
1972:	Beginn des Studiums der Tiermedizin an der Freien Universität Berlin
1974:	Übertritt an die Ludwig-Maximilians-Universität in München
1977:	Abschluß der Tierärztlichen Prüfung
1977:	Approbation als Tierärztin
1977:	Aufnahme der Tätigkeit als Assistentin in einer Gemischtpraxis
1979:	Beginn der Dissertationsarbeit am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, München
1980:	Anstellung als Assistentin am Institut für Tierwissenschaften, Angewandte Zoologie der Technischen Universität in Weihenstephan